



**Francisco Sousa de Oliveira**

Licenciado em Bioquímica

**Desenvolvimento de novas ferramentas  
analíticas para a monitorização da  
actividade da Paraoxonase 1 em  
amostras de plasma humano**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Doutora Maria Gabriela Machado de  
Almeida, Professora Associada, Instituto Superior de  
Ciências da Saúde Egas Moniz

Co-orientador: Doutora Sofia de Azeredo Gaspar Pereira,  
Professora Associada, Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Arguente: Prof. Doutor Stéphane Pierre Besson

Vogal: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2015**





FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



**Francisco Sousa de Oliveira**

Licenciado em Bioquímica

**Desenvolvimento de novas ferramentas  
analíticas para a monitorização da  
actividade da Paraoxonase 1 em  
amostras de plasma humano**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Doutora Maria Gabriela Machado de  
Almeida, Professora Associada, Instituto Superior de  
Ciências da Saúde Egas Moniz

Co-orientador: Doutora Sofia de Azeredo Gaspar Pereira,  
Professora Associada, Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Nova de Lisboa

**Março de 2015**



## Copyright

### **“Desenvolvimento de novas ferramentas analíticas para a monitorização da actividade da Paraoxonase 1 em amostras de plasma humano”**

Copyright © Francisco Sousa de Oliveira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho só foi possível devido ao contributo de algumas pessoas.

Em primeiro lugar, queria agradecer à Doutora Maria Gabriela Almeida pelo seu apoio, orientação e disponibilidade que demonstrou. Um muito obrigado por ter me ter aceite no seu projecto e por contribuir para o meu sucesso a nível académico. Queria agradecer também à Doutora Célia Silveira pela sua disponibilidade, incentivo, encorajamento e apoio que demonstrou. Deixo um agradecimento especial pelo contributo da Mestre Ana Teresa Lopes, do Mestre Tiago Monteiro e da Mestre Patrícia Rodrigues na realização deste projecto.

Agradeço à Doutora Sofia Azeredo Pereira e à Mestre Clara Dias que se demonstraram sempre disponíveis para esclarecer todas as minhas dúvidas.

Queria agradecer a todo o grupo de bioinorgânica e ao grupo de biomarcadores e biossensores que me receberam de braços abertos.

Gostaria de fazer um agradecimento à Doutora Luísa Maia, que desde a realização do meu projecto de bioquímica esteve sempre disponível para me acompanhar tanto a nível académico como pessoal. Um muito obrigado pelo seu voto de confiança, apoio e amizade.

Gostaria de agradecer à Elena Valeria Girus pela sua amizade, companhia e partilha ao longo destes anos. És uma pessoa humilde que está se disposta a ajudar o próximo sem nada em troca. Obrigado do fundo do meu coração pela tua amizade que tenho a certeza que irá durar uma vida.

Queria agradecer à Carla Isabel Ferreira pela sua amizade, conselhos e disponibilidade. Obrigado pela tua amizade e por fazeres parte da minha vida.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de gabinete e de laboratório: Luís Fonseca, Raquel Amador e Joana Sousa pelo seu apoio e amizade.

Finalmente, mas não em último lugar, queria agradecer à minha família e a toda a família Cruz, que me acompanharam desde os meus primeiros passos até agora. Sem vocês e sem o vosso apoio, não estaria onde estou. Queria também agradecer à família Allen, que apesar de não conhecer à tanto tempo, tem sido um grande apoio na minha vida.

A vós todos, um muito obrigado por tudo!





## Abstract

According to World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death in developed countries. There is an urgent need for effective methods of early detection of CVDs due to the lack of conventional risk factors. The prominent levels of homocysteine (Hcy) in blood, homocysteinemia, are a well-established CVD risk factor. According to several authors, the metabolic conversion of Hcy into the toxic metabolite Hcy-Tl and the subsequent protein N-homocysteinylation induces aggregation and amyloid formation, hence contributing to proatherogenic changes in the cardiovascular system.

A high-density lipoprotein (HDL) associated enzyme, paraoxonase 1 (PON1), is able to hydrolyze the toxic metabolite Hcy-Tl back to Hcy in human serum, as seen in recent studies implying the pathogenesis role in CVD of hPON1. Serum paraoxonases (PON1, PON2 and PON3) are calcium-dependent hydrolases, belonging to a family of enzymes that exhibit antioxidative and anti-inflammatory properties. Three main catalytic activities for PON1 have been identified: (i) paraoxonase activity, which corresponds to the hydrolytic conversion of paraoxon into *p*-nitrofenol and diethyl phosphate, (ii) arylesterase activity which promotes the hydrolysis of aromatic esters, and (iii) lactonase activity, which catalyzes the hydrolysis of Hcy-Tl to Hcy, being considered the main activity of PON1. Several studies have linked these enzyme activities to several pathologies, suggesting their potential usefulness in clinical diagnosis.

This work aim to develop a new electrochemical method for an easy detection of both substrate and product of the enzymatic hydrolysis of paraoxon by hPON1. Using an electrochemical cell composed of an Ag/AgCl ref. electrode, a Pt counter electrode and a *Glassy carbon* as working electrode, paraoxon and *p*-nitrofenol were simultaneously detected by square wave voltammetry, within a potential window [-0,3;-1,2] V. The results from the enzyme assay tested at pH 7,6 and 37°C, in the presence of paraoxon and using human plasma as a PON1 source are discussed. Using the same electrochemical cell composition, Hcy and Hcy-Tl were studied with different interfaces and types of treatment to test for the best possible way of detection of both species in the same electrochemical experiment.

**Keywords:** Cardiovascular diseases, Paraoxonase 1, Paraoxon, Homocysteinemia, Homocysteine-thiolactonase, Homocysteine



## Resumo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte nos países desenvolvidos. Há uma necessidade urgente de métodos eficazes para a detecção precoce de doenças cardiovasculares, devido à falta de factores de risco convencionais. Os níveis elevados de homocisteína (Hcy) no sangue, homocisteinemia, são um factor de risco independente bem estabelecido para DCV. De acordo com alguns autores, a conversão metabólica de Hcy no metabolito tóxico Hcy-Tl e subsequente N-homocisteinilação de proteínas induz a agregação e a formação de amiloide, contribuindo assim para a alterações próaterogénicas no sistema cardiovascular.

A enzima associada à lipoproteína de alta densidade (*HDL*), paraoxonase 1 (PON1), é capaz de hidrolisar o metabolito tóxico Hcy-Tl de volta a Hcy no soro humano, como observado em estudos recentes que indicam o papel de patogénese em DCV da hPON1. As paraoxonases de soro (PON1, PON2 e PON3) são hidrolases dependentes de cálcio, que pertencem a uma família de enzimas que exibem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Foram identificadas três actividades catalíticas principais para PON1: (i) actividade paraoxonase, que corresponde à conversão hidrolítica de paraoxon em *p*-nitrofenol e a dietil fosfato, (ii) a actividade arilesterase que promove a hidrólise de ésteres aromáticos, e a (iii) actividade de lactonase, que catalisa a hidrólise de Hcy a Hcy-Tl, sendo considerada a actividade principal da PON1. Vários estudos têm relacionado estas actividades enzimáticas a diversas patologias, o que sugere a sua potencial utilidade no diagnóstico clínico.

Neste trabalho pretende-se desenvolver um novo método electroquímico para a detecção fácil do substrato e produto resultantes da hidrólise enzimática de paraoxon pela hPON1. Utilizando uma célula electroquímica constituída por um eléctrodo de referência Ag /AgCl., um contra-eléctrodo de Pt e um electrodo de trabalho de carbono vítreo, o paraoxon e *p*-nitrofenol foram detectados simultaneamente por voltametria de onda quadrada, numa janela de potencial de [-0,3;-1,2] V. Os resultados dos ensaios com a enzima testada a pH 7,6 e 37°C, na presença de paraoxon e utilizando plasma humano como uma fonte de PON1 serão discutidos. Usando a mesma composição de célula electroquímica, Hcy e Hcy-Tl foram estudados utilizando diferentes interfaces e tipos de tratamento para testar a melhor maneira possível de detecção das duas espécies na mesma experiência electroquímica.

**Palavras-chave:** Doenças cardiovasculares, Paraoxonase 1, Paraoxon, Homocisteinemia, Homocisteína-tiolactonase, Homocisteína



## Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>v</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de tabelas .....</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1.Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1-Doenças cardiovasculares .....	1
1.2- Homocisteína .....	3
1.2.1-Metabolismo da Homocisteína.....	3
1.2.2-Várias formas de Homocisteína .....	5
1.3-A importância da família de enzimas PONs .....	7
1.4-Paraoxonase 1 (PON1).....	9
1.5- Electroquímica .....	12
1.5.1- Conceitos teóricos.....	12
1.5.2-Voltametria .....	13
1.5.3-Sistema electroquímico .....	14
1.5.4-Técnicas de voltametria .....	15
1.6-Desenvolvimento de um biossensor.....	17
1.7-Objectivos .....	19
<b>2.Materiais e Métodos .....</b>	<b>21</b>
2.1-Reagentes e soluções.....	21
2.2-Ensaio electroquímico.....	21
2.3-Ensaio enzimático .....	23
2.3.1-Obtenção de plasma humano .....	23
2.3.2- Condições dos ensaios enzimáticos e de controlo.....	23
2.3.3-Ensaio espectrofotométrico.....	23
2.3.4-Ensaio electroquímico.....	24

<b>3.Resultados e discussão .....</b>	<b>25</b>
3.1-Resposta electroquímica de <i>p</i> -nitrofenol e paraoxon-estudos de efeito de temperatura e do pH.....	25
3.1.1- <i>p</i> -nitrofenol .....	25
3.1.2- Paraoxon .....	26
3.2-Estudo da influência da variação de frequência do varrimento de potencial .....	28
3.3-Quantificação de paraoxon e <i>p</i> -nitrofenol por voltametria de onda quadrada .....	30
3.4-Ensaio enzimático da actividade de POase da hPON1 por VOQ .....	33
3.4.1-Estudos controlo.....	33
3.4.2-Actividade enzimática.....	35
3.5-Estudo da actividade de POase de hPON1 por espectroscopia Uv-Vis .....	36
3.5.1-Ensaio controlo.....	36
3.5.2-Actividade enzimática.....	38
3.6-Comparação das actividades de POase de hPON1 por ensaios electroquímicos de VOQ e por espectroscopia Uv-Vis .....	39
3.7-Estudo do sistema Homocisteína / Homocisteína-tiolactona .....	40
3.7.1-Optimização de interface do eléctrodo de trabalho.....	40
3.7.2-Quantificação de Hcy/Hcy-Tl.....	42
3.7.3-Pré-tratamentos .....	47
3.7.4-Estudo preliminar da actividade de lactonase da hPON1 .....	50
 <b>4.Conclusão .....</b>	 <b>53</b>
 <b>5.Bibliografia .....</b>	 <b>55</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b>	<b>Página 2</b>	Representação esquemática do desenvolvimento de aterosclerose em comparação com uma artéria de um indivíduo saudável, adaptado de Witte 2012.
<b>Figura 1.2</b>	<b>Página 3</b>	Metabolismo da Homocisteína (Hcy). A Hcy pode ser remetilada iniciando o ciclo da metionina (composto pelas enzimas metionina adenosiltransferase - MAT, metiltransferase, S-Adenosil-Hcy hidrolase - SAH hidrolase, metionina sintase ou betaína-Hcy metiltransferase - BHMT); ou pode prosseguir para a via de transulfuração (sendo convertida a cistationina - Cyst, pela cistationina $\beta$ -sintase - CBS, onde é posteriormente convertida em cisteína - Cys pela cistationina $\gamma$ liase - CSE). A conversão de Hcy a Hcy-TI pela enzima Metionil-tRNA Sintetase (MetRS) pode ser reversível por uma enzima Hcy-tiolactonase (Hcy-Tltase), impedindo a formação de N-Hcy-Proteínas.
<b>Figura 1.3</b>	<b>Página 6</b>	Formas de Hcy livre (ex: Hcy na forma reduzida; Hcy-S-S-Hcy e Cys-S-S-Hcy) e de Hcy ligada a proteínas (ex:Albumina-Hcy-S-S-Hcy).
<b>Figura 1.4</b>	<b>Página 8</b>	Mecanismos gerais da actividade de hidrólise da PON1 para diferentes substratos: (A) Fosfotriesteres (actividade de POase), (B) Esteres (actividade de AREase),(C) Actividade de Lactonase, e (D) Hidrólise de agentes nervosos.
<b>Figura 1.5</b>	<b>Página 10</b>	(A)Representação em cartoon da enzima PON1 (código PDB:1V04) e respectivos (B) sítios de ligação dos dois íões de cálcio na PON1;(Ca1-“calcio catalítico;”Ca2-“calcio estrutural” ).
<b>Figura 1.6</b>	<b>Página 11</b>	(A)Estrutura terciária da rePON1 e (B) a sua associação à HDL descrita por Harrel 2004.
<b>Figura 1.7</b>	<b>Página 15</b>	Representação esquemática de uma célula electroquímica, adaptado de Harvey 1999.
<b>Figura 1.8</b>	<b>Página 15</b>	(A)Esquema do perfil geral de uma experiência de voltametria cíclica e um (B) voltamograma cíclico típico reversível.
<b>Figura 1.9</b>	<b>Página 16</b>	Aplicação do potencial numa experiência de VOQ ( $T$ - tempo de pulso, $\Delta E_p$ -variação de potencial).
<b>Figura 1.10</b>	<b>Página 17</b>	Representação esquemática geral de VOQs de um sistema (a) reversível e (b) irreversível, retirado de Souza 2003.
<b>Figura 1.11</b>	<b>Página 18</b>	Composição de um biossensor e descrição dos seus processos.
<b>Figura 3.1</b>	<b>Página 25</b>	Resposta electroquímica por VOQ a uma concentração fixa de <i>p</i> -nitrofenol (200 $\mu$ M), para combinações de pH (a e b, pH 7,6; c e d, pH 10,5) e de temperatura (b e d, $T=25^\circ\text{C}$ ; a e c, $T=37^\circ\text{C}$ ) num eléctrodo de trabalho de CV.
<b>Figura 3.2</b>	<b>Página 27</b>	Resposta electroquímica por VOQ a uma concentração fixa de paraoxon (200 $\mu$ M), para combinações de pH (a e b, pH 7,6; c e d, pH 10,5) e de temperatura (b e d, $T=25^\circ\text{C}$ ; a e c, $T=37^\circ\text{C}$ ) num eléctrodo de trabalho de CV.
<b>Figura 3.3</b>	<b>Página 29</b>	Efeito da variação de frequência de varrimento de potencial do voltamograma de onda quadrada na redução de <i>p</i> -nitrofenol a pH 7,6 á temperatura ambiente para um concentração fixa de 100 $\mu$ M (10 até 100Hz), num eléctrodo de trabalho de CV. <i>Incidência:</i> Variação de corrente do pico catódico com a frequência aplicada ( $y=0,071x+2,215$ ; $R^2=0,995$ ).
<b>Figura 3.4</b>	<b>Página 30</b>	Dependência linear do potencial do pico com o logaritmo da frequência aplicada para uma concentração fixa de 100 $\mu$ M <i>p</i> -nitrofenol a pH 7,6 á temperatura ambiente ( $y=-0,014x-0,752$ ; $R^2=0,996$ ) num eléctrodo de trabalho de CV.

<b>Figura 3.5</b>	<b>Página 32</b>	Quantificação de (A) paraoxon e (B) <i>p</i> -nitrofenol a um valor de pH=7,6 e a uma temperatura de 37°C, por ensaios electroquímicos de VOQ. <i>Incidência:</i> Dependência linear da variação de corrente em relação a concentrações crescentes de (a) paraoxon ( $y=0,068+0,777x$ ; $R^2=0,997$ ) e de (b) <i>p</i> -nitrofenol ( $y=0,055+0,362x$ ; $R^2=0,998$ ) e respectivo desvio padrão.
<b>Figura 3.6</b>	<b>Página 34</b>	Voltamogramas de onda quadrada relativos aos ensaios controlo de (A) estabilidade (200µM paraoxon na ausência de plasma), (B) de actividade residual (200µM paraoxon, sem adição de cálcio, na presença de plasma) e (C) de inibição por EDTA (200µM paraoxon, com adição de EDTA, na presença de plasma) observados a pH 7,6 e a 37°C utilizando um eléctrodo de trabalho de CV. <i>Incidência:</i> Voltamogramas relativos ao (a) tempo inicial e (b) ao fim de 60 minutos dos respectivos ensaios.
<b>Figura 3.7</b>	<b>Página 35</b>	Ensaio enzimático por VOQ efectuado a pH 7,6 e a 37°C para uma concentração fixa de 200µM de paraoxon. <i>Incidência:</i> Intensidade de corrente referente ao sinal electroquímico produzido pelo <i>p</i> -nitrofenol ao longo do tempo.
<b>Figura 3.8</b>	<b>Página 36</b>	Variação da velocidade inicial da reacção de POase da hPON1 do plasma nos ensaios enzimáticos por VOQ com a concentração de paraoxon. Ajuste dos dados segundo uma regressão não linear de acordo com a equação de Michaelis-Menten ( $K_m=1,3 \pm 0,3\mu M$ , $V_{max}=31 \pm 3\mu M \text{ min}^{-1}$ ; $R^2=0,987$ ), onde cada ponto corresponde à média de 3 ensaios e a barra de erro corresponde ao desvio padrão. Os ensaios foram efectuados a pH 7,6 e a 37°C.
<b>Figura 3.9</b>	<b>Página 37</b>	Espectro de absorvância relativo aos ensaios de controlo e de actividade enzimática (nas condições impostas como óptimas nos ensaios electroquímicos) ao fim de 10 minutos. <i>Incidência:</i> Absorvância a $\lambda_{405nm}$ dos vários ensaios de controlo: (a) Ensaio de estabilidade; (b) Ensaio de actividade residual de POase da hPON1; (c) Ensaio de inibição da actividade de POase da hPON1; (d) Ensaio da actividade enzimática de POase da hPON1.
<b>Figura 3.10</b>	<b>Página 38</b>	Variação do sinal do <i>p</i> -nitrofenol verificado a $\lambda_{405nm}$ em espectroscopia Uv-Vis. <i>Incidência:</i> Conversão da absorvância verificada em concentração de <i>p</i> -nitrofenol ( $y=1,019x+0,386$ ; $R^2=0,997$ ).
<b>Figura 3.11</b>	<b>Página 39</b>	Variação da velocidade inicial da reacção de POase da hPON1 do plasma nos ensaios enzimáticos por espectroscopia Uv-Vis com a concentração de paraoxon. Ajuste dos dados segundo uma regressão não linear de acordo com a equação de Michaelis-Menten ( $K_m=0,43 \pm 0,09mM$ , $V_{max}=4,7 \pm 0,4\mu M \text{ min}^{-1}$ ; $R^2=0,970$ ), onde cada ponto corresponde à média de 3 ensaios e a barra de erro corresponde ao desvio padrão. Os ensaios foram efectuados a pH 7,6 e a 37°C.
<b>Figura 3.12</b>	<b>Página 41</b>	Detecção electroquímica da Hcy (200µM) a pH 7,6 à temperatura ambiente aplicando nanotubos de carbono de (A) O <sub>2</sub> 500, (B) de Ureia, (C) de HNO <sub>3</sub> e (D) de HNO <sub>3</sub> 400 ao eléctrodo de GP. A linha a tracejado corresponde ao branco e a linha contínua à reposta da Hcy.
<b>Figura 3.13</b>	<b>Página 42</b>	Resposta electroquímica da Hcy (200µM) a pH 7,6 à temperatura ambiente, utilizando (A) platina, (B) filme de paládio e (C) nanopartículas de WO <sub>3</sub> aplicadas ao eléctrodo de GP (1mg/ml em água), como interfaces de eléctrodo de trabalho. A linha a tracejado corresponde ao branco e a linha contínua à reposta da Hcy.
<b>Figura 3.14</b>	<b>Página 43</b>	Detecção electroquímica de Hcy em eléctrodos de GP. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy (12,5-200µM) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação da corrente do pico para várias concentrações de Hcy ( $y=0,028x+0,380$ ; $R^2=0,996$ ). Os ensaios foram realizados em triplicados tendo-se representado o valor médio de corrente e respectivo desvio padrão
<b>Figura 3.15</b>	<b>Página 43</b>	Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica de Hcy num eléctrodo de GP. VCs obtidos para uma concentração de Hcy de 200µM a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,823x+0,194$ ; $R^2=0,9997$ ).



<b>Figura 3.16</b>	<b>Página 44</b>	Detecção electroquímica de Hcy-Tl em eléctrodos de GP. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy-Tl (0,1-1,5mM) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação da corrente do pico anódico para várias concentrações de Hcy-Tl ( $y=0,270-0,020$ ; $R^2=0,997$ ). Os ensaios foram realizados em triplicados tendo-se representado o valor médio de corrente e respectivo desvio padrão.
<b>Figura 3.17</b>	<b>Página 44</b>	Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica de Hcy-Tl num eléctrodo de GP. VCs obtidos para uma concentração de Hcy-Tl de 1,5mM a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,082x+0,131$ ; $R^2=0,985$ ).
<b>Figura 3.18</b>	<b>Página 45</b>	Detecção electroquímica de Hcy em eléctrodos de CV. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy (12,5-200 $\mu$ M) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação da corrente do pico anódico para várias concentrações de Hcy ( $y=0,017x+0,419$ ; $R^2=0,9889$ ). Os ensaios foram realizados em triplicados tendo-se representado o valor médio de corrente e respectivo desvio padrão.
<b>Figura 3.19</b>	<b>Página 45</b>	Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica da Hcy num eléctrodo de CV. VCs obtidos para uma concentração de Hcy de 200 $\mu$ M a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,391x+0,455$ ; $R^2=0,979$ ).
<b>Figura 3.20</b>	<b>Página 46</b>	Detecção electroquímica de Hcy-Tl em eléctrodos de CV. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy-Tl (0,8-1,5mM) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação da corrente do pico anódico para várias concentrações de Hcy-Tl ( $y=0,367x+0,077$ ; $R^2=0,996$ ).
<b>Figura 3.21</b>	<b>Página 46</b>	Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica de Hcy-Tl num eléctrodo de GP. VCs obtidos para uma concentração de Hcy-Tl de 1,5mM a pH 7,6 e à temperatura ambiente. <i>Incidência:</i> Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,086x-0,029$ ; $R^2=0,983$ ).
<b>Figura 3.22</b>	<b>Página 48</b>	Ensaio de quantificação de Hcy-Tl a pH 7,6 à temperatura ambiente utilizando um (A) pré-tratamento na solução electrolítica e (B) um pré-tratamento em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , num eléctrodo de trabalho de CV.
<b>Figura 3.23</b>	<b>Página 48</b>	Linearizações obtidas para os pré-tratamentos efectuados ao eléctrodo de trabalho de CV na quantificação de Hcy-Tl a pH 7,6 à temperatura ambiente: (a) sem pré-tratamento ( $y=0,367x+0,077$ ; $R^2=0,9965$ ), (b) pré-tratamento efectuado na solução de electrolítica ( $y=0,342x+0,115$ ; $R^2=0,976$ ) e (c) pré-tratamento em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ( $y=0,816x+0,0099$ ; $R^2=0,9991$ ).
<b>Figura 3.24</b>	<b>Página 49</b>	Ensaio de quantificação de Hcy a pH 7,6 à temperatura ambiente utilizando um (A) pré-tratamento na solução electrolítica e (B) um pré-tratamento em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , num eléctrodo de trabalho de CV.
<b>Figura 3.25</b>	<b>Página 49</b>	Linearizações obtidas para os pré-tratamentos efectuados ao eléctrodo de trabalho de CV na quantificação de Hcy a pH 7,6 à temperatura ambiente: (a) sem pré-tratamento ( $y=0,017x+0,419$ ; $R^2=0,989$ ), (b) pré-tratamento efectuado na solução de electrolítica ( $y=0,017x+0,078$ ; $R^2=0,992$ ) e (c) pré-tratamento em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ( $y=0,018x-0,042$ ; $R^2=0,9994$ ).
<b>Figura 3.26</b>	<b>Página 50</b>	Ensaio de actividade de lactonase da hPON1 a uma concentração fixa de Hcy-Tl (200 $\mu$ M) ao longo do tempo (até 120 minutos). Ensaio efectuado a pH 7,6 à temperatura ambiente, para um volume de plasma de (A) 200 $\mu$ l e de (B) 400 $\mu$ l em 10 ml de solução electrolítica, num eléctrodo de trabalho de CV.
<b>Figura 3.27</b>	<b>Página 51</b>	Resposta electroquímica (tempo inicial, $t=0$ min) dos ensaios de actividade de lactonase da hPON1 a uma concentração fixa de Hcy-Tl (200 $\mu$ M), para um volume de plasma de (a) 200 $\mu$ l e de (b) 400 $\mu$ l, comparativamente a um ensaio controlo de (c) 200 $\mu$ l de plasma (sem Hcy-Tl) em 10 ml de solução electrolítica total. Ensaio efectuado a pH 7,6 à temperatura ambiente, num eléctrodo de trabalho de CV.



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1</b>	<b>Página 1</b>	Designação dos vários factores de risco de desenvolvimento de DCVs, segundo a OMS.
<b>Tabela 1.2</b>	<b>Página 6</b>	Concentração de espécies de Hcy observadas em sangue humano (resumido por Jakubowski 2006).
<b>Tabela 3.1</b>	<b>Página 26</b>	Valores de potencial do pico de <i>p</i> -nitrofenol obtidos em ensaios de VOQ a diferentes pH e temperaturas. Os ensaios foram realizados com um eléctrodo de carbono vítreo com uma concentração de <i>p</i> -nitrofenol de 200µM.
<b>Tabela 3.2</b>	<b>Página 26</b>	Estudos de quantificação de <i>p</i> -nitrofenol utilizando diferentes eléctrodos de trabalho com modificações de superfície.
<b>Tabela 3.3</b>	<b>Página 27</b>	Valores de potencial do pico de paraoxon obtidos em ensaios de VOQ a diferentes pH e temperaturas. Os ensaios foram realizados com um eléctrodo de carbono vítreo com uma concentração de paraoxon de 200µM.
<b>Tabela 3.4</b>	<b>Página 31</b>	Comparação de parâmetros analíticos referentes à calibração do paraoxon e <i>p</i> -nitrofenol para as várias combinações de pH (7,6 e 10,5) e de temperatura (25 °C e 37°C) , utilizando o eléctrodo de CV como eléctrodo de trabalho.
<b>Tabela 3.5</b>	<b>Página 47</b>	Valores de potenciais do pico anódico de Hcy e Hcy-Tl nos ensaios de VC a pH 7,6 e à temperatura ambiente para os vários pré-tratamentos e a sensibilidade (do eléctrodo de trabalho de CV) para estes.



## Lista de abreviaturas

ACV	Acidente cardiovascular
AREase	Arilesterase
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BHMT	Betaína-homocisteína metiltransferase
BLH	Bleomicina hidrolase
CBS	Cistationina $\beta$ -sintase
CSE	Cistationina $\gamma$ liase
Cys	Cisteína
Cyst	Cistationa
CV	Carbono vítreo
DCV(s)	Doença(s) cardiovasculare(s)
GP	Grafite pirolítica
Hcy	Homocisteína
HcyT	Homocisteína total
Hcy-TI	Homocisteína-tiolactona
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
hPON1	Paraoxonase 1 humana
Htase	Homocisteína-tiolactonase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAT	Metionina adenosiltransferase
Met	Metionina
MetRS	Metionil-tRNA Sintetase
OMS	Organização Mundial de Saúde
POase	Paraoxonase (atividade)
POCT	<i>Point-of-care testing</i>
PON(s)	Paraoxonase(s) (enzima)
SAH	S-Adenosil-Homocisteína
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
Uv-Vis	Ultravioleta-visível



## 1.Introdução

### 1.1-Doenças cardiovasculares

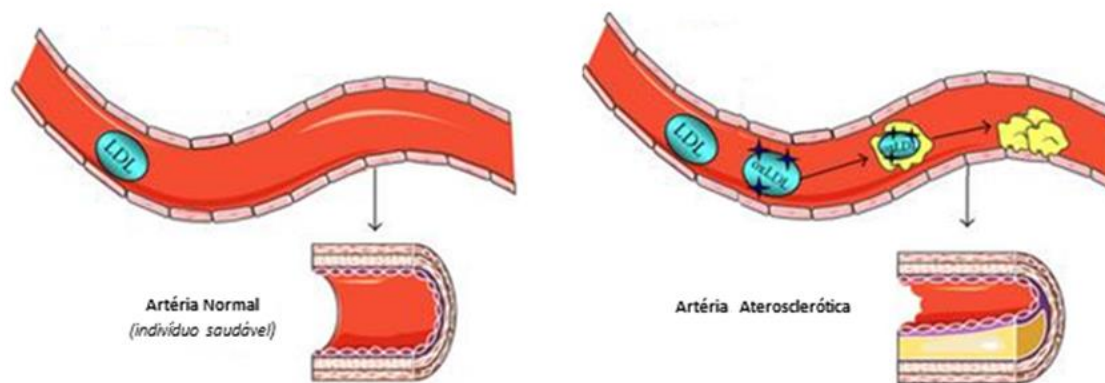
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte nos países desenvolvidos. No ano 2012, cerca de 30% da totalidade de mortes a nível global foram provocadas por DCVs (17,5 milhões de indivíduos) das quais 13% resultaram de níveis de pressão arterial elevada, 9% de tabagismo, 6% de inactividade física/sedentarismo, 6% de diabetes e 5% relacionados com obesidade e excesso de peso (Mendis 2011).

Apesar de uma grande porção das DCVs poderem ser prevenidas e de a esperança média de vida ter vindo a aumentar para ambos os sexos, o número de óbitos a nível global tem vindo a aumentar desde a década de 90 (McGil Jr 2008). A principal causa apontada pela OMS é o facto de as medidas preventivas serem inadequadas, pelo que no ano 2013 foi accionado um mecanismo a nível global (194 países) para a prevenção e redução de doenças crónicas até 2020 (Mendis 2011). Segundo a OMS, a mensagem geral tem de ser clara e esclarecedora sobre os três tópicos fulcrais a colmatar: (i) a importância da vigilância de modo a mapear e monitorizar epidemias de DCVs, (ii) a prevenção de DCVs, comunicando a exposição dos vários factores de risco que estão na base do desenvolvimento destas (Tabela 1.1) e, (iii) a gestão necessária para que existam cuidados de saúde equivalentes para todos os cidadãos de modo a providenciar o tratamento necessário a indivíduos que sofram de DCVs (Mendis 2011).

**Tabela 1.1: Designação dos vários factores de risco de desenvolvimento de DCVs, segundo a OMS.**

Factores de Risco		
Comportamentais	Metabólicos	Outros
Consumo de tabaco	Elevados níveis de pressão sanguínea nas artérias (ex: hipertensão)	<b>Financeiros/Educacionais</b> (Pobreza e falta de educação)
Sedentarismo	Elevados níveis de açúcar na corrente sanguínea (ex: diabetes)	<b>Biológicos</b> (Sexo e idade avançada)
Dieta não saudável (excesso de sal e gorduras)	Elevados níveis de lípidos (ex: colesterol)	<b>Psicológicos</b> (Stress, depressão)
Excesso no consumo de álcool	Obesidade ou excesso de peso	<b>Genéticos e outros</b> (disposição genética, excesso de homocisteína)

De um modo geral, podemos descrever as DVCs como estando directamente ou indirectamente relacionadas com o desenvolvimento de aterosclerose. A aterosclerose é uma doença crónica e vascular que pode ser definida como uma acumulação local de lípidos, material gordo e células que se depositam no lúmen de vasos sanguíneos de tamanho médio e grande como as artérias (Figura 1.1) (Lusis 2000).



**Figura 1.1:** Representação esquemática do desenvolvimento de aterosclerose em comparação com uma artéria de um indivíduo saudável, adaptado de Witte 2012.

Doenças na aorta e nas artérias (ex: doença vascular periférica, hipertensão), doenças cerebrovasculares (ex: acidente vascular cerebral) e doenças da artéria coronária e isquémia (ex: ataque cardíaco), são exemplos de doenças directamente relacionadas com o desenvolvimento de aterosclerose. O excesso de deposição de placa pode levar à sua ruptura e à formação de um coágulo de sangue, podendo ser a causa de um ataque cardíaco (se o coágulo se desenvolver numa artéria coronária) ou de um acidente vascular cerebral (se for desenvolvido no cérebro) (Witte 2012, Lusis 2000). Outras DVCs importantes, tais como a cardiopatia reumática (provocada por danos causados aos músculos e válvulas do coração através da febre reumática), a doença cardíaca congénita (resultado de más formações nas estruturas cardíacas resultando de anomalias nas válvulas em câmaras cardíacas e/ou buracos no septo do coração), cardiomiopatia (desordens no miocárdio) e arritmias cardíacas (distúrbios e perturbações que alteram a frequência e ritmo dos batimentos cardíacos) são resultado de doenças provocadas, de um modo geral, por danos/deformações, não estando directamente relacionadas com a aterosclerose (McGil Jr 2008, Mendis 2011).

Actualmente a detecção precoce de DVCs é efectuada pela avaliação de critérios de alto risco (Tabela 1.1) e pelo historial familiar de DVCs, por resultados anormais efectuados em ensaios rotineiros ao sangue/urina (na detecção de anemia, problemas de tiróide e de alto colesterol) ou a execução de um electrocardiograma e/ou Raio-X ao peito (na detecção de problemas de batimento cardíaco anormal e/ou se o coração tem um volume excessivo) (Benisty 2002).



A existência de um número substancial de mortes numa faixa etária relativamente jovem levam à necessidade de descoberta de novos factores de risco, não convencionais, como a hipertensão e diabetes. O tratamento de DCVs é um processo lento e progressivo pelo que existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de um método eficiente para a detecção rápida e precoce de DCVs.

## 1.2- Homocisteína

### 1.2.1-Metabolismo da Homocisteína

A Homocisteína (Hcy) é um aminoácido que foi sintetizado pela primeira vez em 1932 por Du Vigneau quando começou a estudar o metabolismo do enxofre. É um aminoácido importante que contém uma unidade de tiol livre (R-SH) não sendo encontrado directamente na dieta.

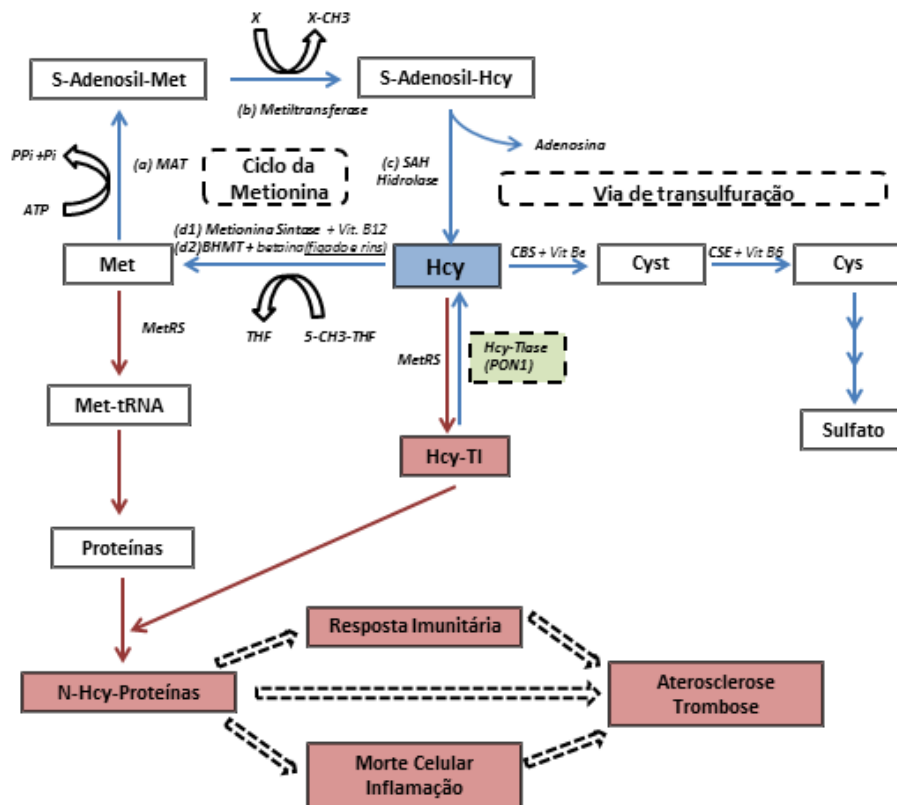


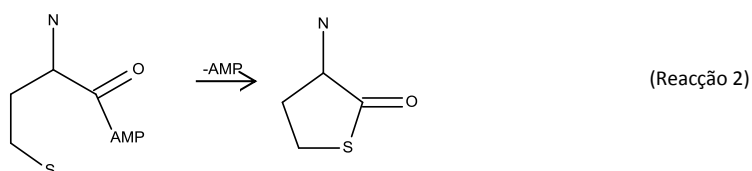
Figura 1.2: Metabolismo da Homocisteína (Hcy). A Hcy pode ser remetida iniciando o ciclo da metionina (composto pelas enzimas metionina adenosiltransferase - MAT, metiltransferase, S-Adenosil-Hcy hidrolase - SAH hidrolase, metionina sintase ou betaina-Hcy metiltransferase - BHMT); ou pode prosseguir para a via de transulfuração (sendo convertida a cistationina - Cyst, pela cistationina β-sintase - CBS, onde é posteriormente convertida em cisteína - Cys pela cistationina γ liase - CSE). A conversão de Hcy a Hcy-TI pela enzima Metionil-tRNA Sintetase (MetRS) pode ser reversível por uma enzima Hcy-tiolactonase (Hcy-TIase), impedindo a formação de N-Hcy-Proteínas.

Em mamíferos, a formação de Hcy é formada a partir de intermediários durante o metabolismo da Metionina (Met) através de reacções de metilação a nível celular (Jakubowski 2000,2002,2010).

Inicialmente a Met é activada por uma molécula de ATP, a fim de se obter S-Adenosil-Met (Figura 1.2, reacção a). Devido à transferência do grupo metil da S-Adenosil-Met para uma molécula aceitadora do grupo metil, a S-Adenosil-Met é convertida a S-Adenosil-Hcy através da enzima Metiltransferase (Figura 1.2, reacção b). A hidrólise enzimática da S-Adenosil-Hcy a Hcy, é o único caminho conhecido como fonte de Hcy no corpo humano (Figura 1.2, reacção c). A Hcy pode ser convertida a Met (completando assim o ciclo da Met) através de duas reacções diferentes: através da enzima Metionina Sintase requerendo um doador de grupo metil (5-metiltetrahidrofolato; 5-CH<sub>3</sub>-THF) e utilizando a vitamina B12 como co-factor enzimático (Figura 1.2, reacção d1), ou através da enzima Betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT) utilizando a vitamina B10 (betaína) como co-factor (Figura 1.2, reacção d2) (Jakubowski 2006,Usuki 2012).

Quando a Hcy é formada, metade da Hcy será remetilada a Met e a restante prossegue para a via de transulfuração que, através de uma série de reacções, irá produzir sulfato. Este composto é posteriormente secretado na urina. No entanto, a Hcy pode ser metabolizada a Hcy-TI, quando a Hcy é erradamente seleccionada em vez da Met pela enzima Metionil-tRNA Sintetase (MetRS). A descoberta desta conversão reforçou a importância biológica à Hcy-TI, tal como é discutido de seguida.

A formação de Hcy-TI através de Hcy é efectuada essencialmente em dois passos: inicialmente a MetRS catalisa a reacção de Hcy com ATP, levando à formação de um aducto MetRS homocisteinil adenilato (Reacção 1). No passo final, a AMP do grupo carboxil activado da Hcy é removido, produzindo a Hcy-TI como produto final (Reacção 2) (Jakubowski 2000,2002,2010).



Uma vez que a energia da ligação do anidrido na Hcy-AMP é conservada na ligação tioester da Hcy-TI, a Hcy-TI é quimicamente reactiva. Devido à presença de um grupo tioester

que consegue captar electrões dos átomos na vizinhança para si próprio, o  $pK_a$  do grupo amina da Hcy-TI é de 7,1 (Garel 2006). Este valor é inferior ao  $pK_a$  comparadamente dos grupos amino comuns. Por exemplo, o grupo  $\epsilon$ -amino das cadeias laterais de lisinas tem um  $pK_a$  de 10,6. Este facto pode levar à N-homocisteinilização das proteínas (N-Hcy-Proteínas), provocando modificações na sua estrutura e no seu ponto isoeléctrico, induzido a perda da sua função, a sua desnaturação e precipitação. Como tal, a N-homocisteinilização irá provocar danos irreversíveis nas proteínas através de modificações não programadas, podendo estar na causa do desenvolvimento de aterosclerose (Jakubowski 2010, Garel 2006).

A N-homocisteinilização de proteínas é observada no soro a pH fisiológico (competindo com nucleófilos como a água e com os resíduos de lisina que se encontram desprotonados). No entanto, os factores que regulam a reactividade dos grupos amino com a Hcy-TI ainda não se encontram devidamente estudados, pelo que grupos amino do N-terminal de proteínas possuem valores de  $pK_a$  aproximadamente a 8,5 (valor superior a 7,1). Contudo, estes grupos não sofrem homocisteinilização (Jakubowski 2000).

A conversão de Hcy a Hcy-TI pode ser reversível via uma enzima Hcy-Tlase (exemplo de actividade de lactonase da hPON1): através da destoxificação da Hcy-TI, a hPON1 consegue impedir a formação de N-Hcy-Proteínas (Usuki 2012).

Os níveis de Hcy-TI e das N-Hcy-proteínas (intra e extracelulares) serão influenciados pelos níveis de conversão de Hcy a Met e/ou pelo estado da conversão a sulfato (produto final da via transulfuração). Podem ser também influenciados por algumas proteínas intracelulares que têm uma actividade Hcy-Tlase (tais como bleomicina hidrolase-BLH), assim como pelo complexo de HDL-PON1 (no entanto, apenas num espaço extracelular) (Usuki 2012, Harel 2004).

### **1.2.2- Várias formas de Homocisteína**

O número de publicações sobre o metabolismo da Hcy tem aumentado nos últimos anos devido ao potencial relacionamento de altos níveis de Hcy com estágios iniciais e desenvolvimento de várias DCVs (Usuki 2012, Falk 2001, Nekrassova 2003).

A representação de todas as formas de Hcy presentes no plasma humano é definida como homocisteína total (HcyT) (Figura 1.3).

Em sistemas biológicos, a Hcy apresenta-se como (i) Hcy livre (Hcy sem a ligação a uma proteína), estando incluído a forma reduzida de Hcy, dissulfeto de Hcy (Hcy-S-S-Hcy),

cisteína-Hcy (Cys-S-S-Hcy) e outros tióis de baixo peso molecular; e (ii) a Hcy ligada a uma proteína, que pode ser alcançada quando ocorre uma ligação cruzada de um dissulfureto da Hcy a uma molécula de proteína (proteína-Hcy-S-S-Hcy) (Usuki 2012). Em indivíduos normais, a forma reduzida de Hcy livre (Hcy) representa menos de 2% da HcyT. No entanto, a percentagem total de dissulfitos de baixo peso molecular e dissulfitos mistos pode variar entre 10-30% e cerca de 70-80% para a forma proteína-Hcy-S-S-Hcy (Figura 1.3) (Nekrassova 2003).

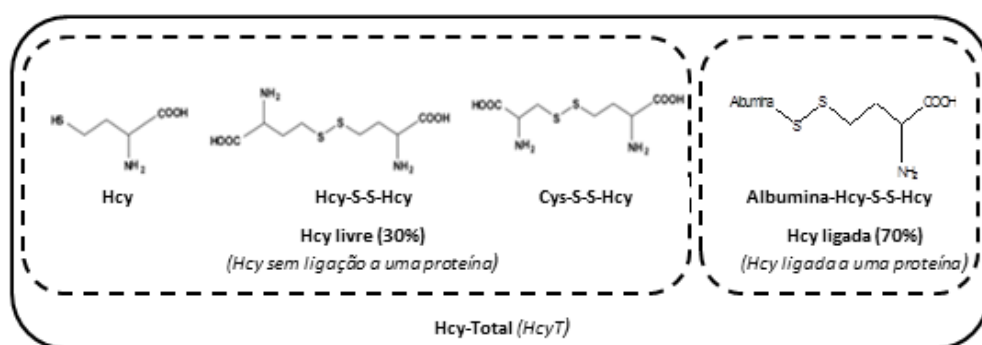


Figura 1.3: Formas de Hcy livre (ex: Hcy na forma reduzida; Hcy-S-S-Hcy e Cys-S-S-Hcy) e de Hcy ligada a proteínas (ex: Albumina-Hcy-S-S-Hcy).

O nível basal de HcyT no plasma situa-se entre 5µM a 15µM. Um indivíduo com níveis mais elevados pode ser afectado por uma condição designada hiper-homocisteinemia (Jakubowski 2006).

Tabela 1.2: Concentração de espécies de Hcy observadas em sangue humano (resumido por Jakubowski 2006).

Espécies de Hcy	Concentração normal no sangue humano
Hcy-TI (produto directo da Hcy)	0-35nM
N-HCy-Hemoglobina	12,7µM
N-(Hcy-S-S-Cys)-Albumina	2,8µM
Hcy	100nM
Hcy-S-S-Hcy	2µM
Hcy-S-S-Cys	
Albumina-Hcy-S-S-Hcy	7,3µM

A hiper-homocisteinemia pode ser classificada como sendo moderada (níveis de Hcy plasmática total até 30µM), intermédia (30-100 µM) ou grave (superior a 100µM). As principais causas de hiper-homocisteinemia são a insuficiência renal crónica ou deficiências de vitamina B12, folato/tetrahydrofolato (que participa na metabolização de Hcy a Met, controlada pela metionina sintase), de vitamina B6 (metabolizando Hcy a Cys através das enzimas B-6 dependentes, cistationina β-sintase [CBS] e cistationina γ-liase [CSE]), entrando na via de

transulfuração a fim de formar sulfato (como um produto final), que é secretado pela urina (Usuki 2012;Jakubowski 2006;Nekrassova 2003).

A determinação de Hcy pode ser efectuada através de ensaios imunológicos (Refsum 1989, Nexø 2000), cromatografia de gás acoplada a espectrómetro de massa (Ueland 1993), HPLC com fluorescente (Okabe 2002), espectrometria de massa (Nelson 2003), cromatografia líquida (Bald 2000) e sistemas electroquímicos (Inoue 2002).

A determinação da Hcy-TI em fluidos humanos foi conseguida através de HPLC (Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples 2002, Chwatko 2005) e cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa (Daneshvar 2003).

### **1.3-A importância da família de enzimas PONs**

As PONs de soro são uma família de enzimas que exibem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, possuindo um papel importante na manutenção de um baixo estado oxidativo na corrente sanguínea. Em 1996, através da descoberta da actividade de paraoxonase (POase) e arilesterase (AREase) da PON1, estabeleceu-se que o gene responsável por estas actividades é membro de uma família multigénica composta por três membros (as esterases PON1, PON2 e PON3) (Primo-Parmo 1996). A PON1 é a enzima mais estudada desta família, partilhando cerca de 60% de identidade de sequência com a PON2 e PON3 (Primo-Parmo 1996, Harel 2004).

Esta família multigénica possui três actividades principais: (i) actividade de POase, que é observada aquando a ocorrência da reacção de hidrólise do paraoxon a *p*-nitrofenol, a (ii) actividade de AREase que promove a reacção de hidrólise de ésteres aromáticos (como o fenilacetato, tiofenilacetato e 2-naftilacetato), e (iii) actividade de lactonase, considerada como actividade principal da PON1 que pode, por exemplo, catalisar a hidrólise de lactonas aromáticas e alifáticas como a Hcy-TI e a dihidroxicumarina. A hPON1(PON1 humana) pode hidrolisar outros substratos metabólitos de compostos organofosforados (insecticidas comuns como o paratión e diazoxon), gases nervosos (como Tabun, Sarin e Soman), e pode até metabolizar fármacos como a Prulifloxacin (Figura 1.4) (Richter 2009, Draganov 2004).

A designação de PON advém do facto de que, originalmente, foi demonstrada que esta enzima é responsável pela hidrólise do paraoxon, produto formado através da reacção do insecticida paratión com o citocromo P450. No entanto, alguns autores defendem que o nome de PON pode ser inadequado, uma vez que estas enzimas têm diversas actividades como referido anteriormente (Draganov 2004, Aviram M 2000, Dias 2014).

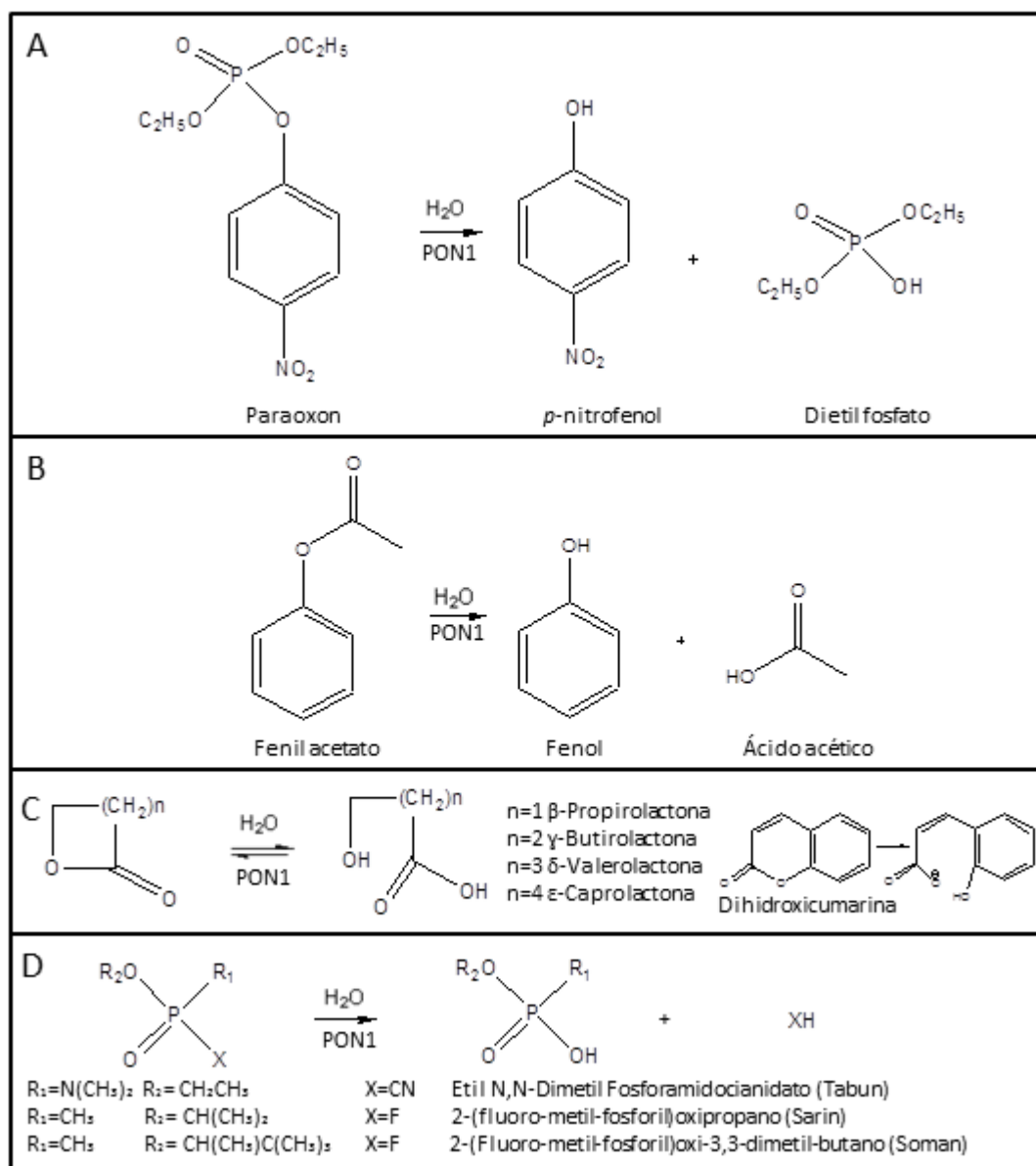
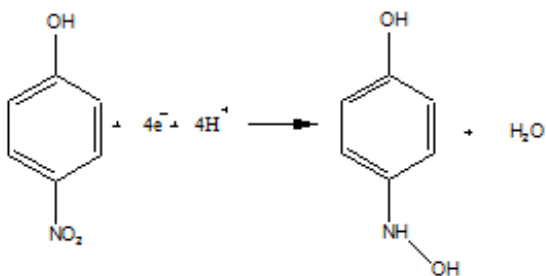


Figura 1.4: Mecanismos gerais da actividade de hidrólise da PON1 para diferentes substratos: (A) Fosfotriesteres (actividade de POase), (B) Esteres (actividade de AREase), (C) Actividade de Lactonase, e (D) Hidrólise de agentes nervosos.

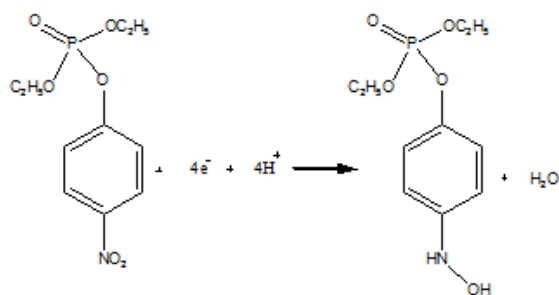
Estudos pré-clínicos não elucidam sobre os substratos fisiológicos específicos e como estes afectam a PON2 e PON3. No entanto, sabe-se que têm propriedades semelhantes à PON1, prevenindo DCVs, cancro e aterosclerose (Witte 2012, Harel 2004, Draganov 2004).

Relativamente à PON1, muitos estudos ponderam o potencial que tem para ser um biomarcador, relacionando as suas actividades catalíticas com o desenvolvimento de diversas fisiopatologias: ACV isquémico (Ito 2002), insuficiência renal crónica (Karban 2007), diabetes tipo 2 (Hofera 2006), síndrome metabólica (Martinelli 2005), doenças neurodegenerativas (como Alzheimer (Dantoine 2002), Parkinson (Zintzaras 2004) e autismo (Paşca 2010)) e alguns tipos de cancro (cancro da mama (Hussein 2011) e da próstata (Marchesani 2003)).

A caracterização da actividade de POase da hPON1 será efectuada electroquimicamente, assumindo as reacções de redução do grupo nitro (R-NO<sub>2</sub>) do *p*-nitrofenol (Reacção 3)/paraoxon (Reacção 4) para um grupo hidroxilamina (R-NHOH) (Souza 2011, Pedrosa 2003) .



(Reacção 3)



(Reacção 4)

#### 1.4-Paraoxonase 1 (PON1)

A enzima sérica PON1 foi descoberta no início dos anos 50 por Abraham Mazur, aquando a primeira descrição da hidrólise enzimática por compostos organofosforados nos tecidos de animais. Durante a mesma década, Aldridge estudou a hidrólise do paraoxon em soro de humanos e de várias espécies de mamíferos. De modo a distinguir as diferentes classes de esterases, Aldridge classificou as esterases que conseguem hidrolisar compostos organofosforados e ésteres aromáticos como “esterases A” (exemplo: paraoxon) e as esterases que são inibidas pelo paraoxon como “esterases B” (Harel 2004, Draganov 2004).

A hPON1 é uma proteína glicosilada classificada como uma esterase A, com uma massa aparente de 43-47kDa (Draganov 2004, Golmanesh 2008). É sintetizada maioritariamente no fígado, em pequenas quantidades, sendo secretada para a corrente sanguínea onde se encontra fortemente ligada à alipoproteína A1 a qual, por sua vez se encontra associada à HDL (Costa 2005).

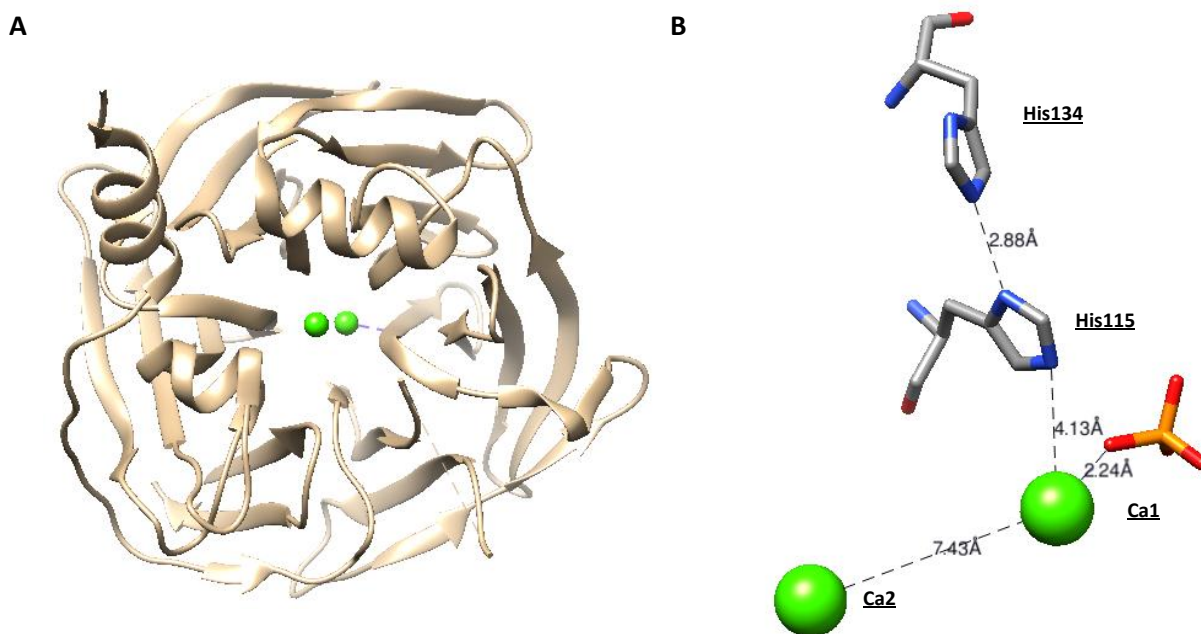


Figura 1.5: (A) Representação em *cartoon* da enzima PON1 (código PDB:1V04) e respectivos (B) sítios de ligação dos dois íões de cálcio na PON1; (Ca1-“cálcio catalítico;” Ca2-“cálcio estrutural”).

A PON1 é uma hidrolase cálcio-dependente, possuindo dois sítios de ligação para íões de cálcio (II) por cada subunidade. Na Figura 1.5 é possível observar ambos os sítios de ligação de íões de cálcio essenciais para manter a estabilidade e potenciar a actividade hidrolítica da PON1 (Harel 2004). A hPON1 requer a presença de cálcio para a sua actividade enzimática, no entanto, alguns íões divalentes (ex:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) mantêm a PON1 numa forma inactiva mas estável (Kuo 1998, Harel 2004).

Durante a determinação da estrutura cristalina da hPON1, verificou-se que esta tende-se a agregar (na ausência de detergente) e que copurificava com outra proteína (proteína desconhecida) (Fokine 2003). Devido à instabilidade da hPON1, a sua estrutura foi resolvida recorrendo a variantes de expressão bacteriana, procedendo-se à determinação de uma variante da PON1, a rePON1. Mais concretamente, a rePON1 é uma variante recombinante da PON1 (podendo ser expressa em *E. coli*) que diverge da forma *wild-type* da PON1 de coelho nos aminoácidos 14-31, aminoácidos estes que provêm de outros genes de PON1 (humano, rato, ratinho, coelho) (Harel 2004).



Os resíduos do N-terminal da variante rePON1 encontram-se todos na área interior hidrofóbica da HDL. Na Figura 1.6, podemos observar os resíduos hidrofóbicos Try185, Phe186; Try190; Trp194 e Trp202 (resíduos a amarelo da cadeia lateral H2) e Lys21 (resíduo amarelo que se encontra entre as fases hidrófobas e hidrófilas da HDL na cadeia H1) que se pensam estarem envolvidos na ligação da PON1 com HDL. Os resíduos a azul são propostos para o centro activo (existe uma selectividade de resíduos nesta região onde se pode definir a principal actividade da PON1); e os resíduos a vermelhos são sítios de glicosilação (Asn253 e Asn324) (Harel 2004).

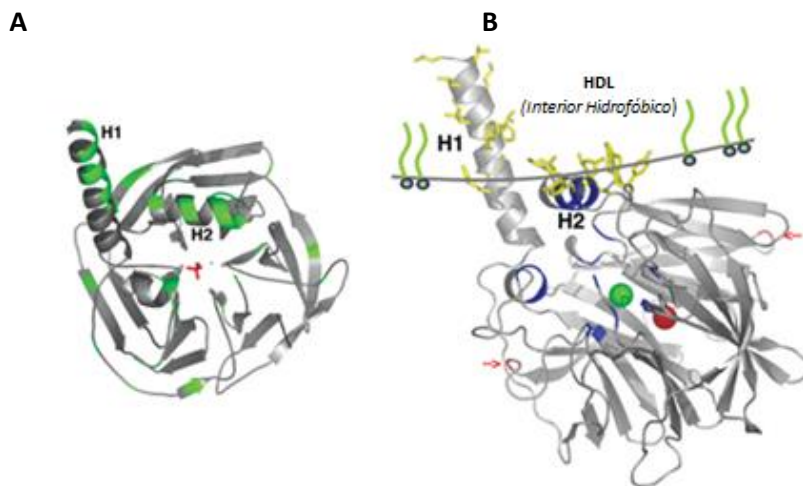


Figura 1.6: (A) Estrutura terciária da rePON1 e (B) a sua associação à HDL descrita por Harrel 2004.

Na literatura, facilmente se encontram diversos estudos que propõem uma correlação entre a actividade da PON1 e o risco de desenvolvimento de aterosclerose e de DCVs. Estudos efectuados em ratos com carência de PON1 sugerem que estes são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de aterosclerose e envenenamento por organofosfatos (Shih 1998).

A presença de PON1 no fígado, na circulação sanguínea ou em alguns tecidos pode proteger de exposição crónica de metabolitos tóxicos. A PON1 pode catalisar, quando secretada para a corrente sanguínea, a hidrólise de vários compostos naturais e sintéticos, comportando-se como um sistema de eliminação de radicais livres (*scavenging system*), ocorrendo a desintoxicação de compostos organofosforados e de radicais lipossolúveis cancerígenos provenientes da peroxidação lipídica. (Mackness 1991, Draganov 2004).

A LDL oxidada ocorre *in vivo* quando a LDL reage com os radicais livres, tornando-se mais reactiva com os tecidos circundantes, podendo assim danificá-los. Uma vez oxidada a LDL, esta pode infiltrar-se directamente em qualquer artéria, através do endotélio. Se esta infiltração for bem sucedida, irá promover a acumulação e agregação de células inflamatórias (como macrófagos e plaquetas), danificando a área infectada. Com a continuidade, ocorre a

formação de uma placa que tornar-se-à mais espessa, reduzindo a quantidade de fluxo sanguíneo na artéria e promovendo, assim, fases iniciais de várias DCVs. Está comprovado que a PON1 e PON3 inibem a oxidação lipídica na LDL. Este facto está provavelmente relacionado com a capacidade que têm de hidrolisar fosfolípidos oxidados presentes na LDL oxidada, reduzindo assim os níveis de lípidos oxidados e evitando estágios iniciais da aterosclerose (Figura 1.1, secção 1.1) (Reddy 2001, Mackness 1991).

A PON1 tem uma maior actividade de POase para substratos sintéticos do que os restantes membros da família da PON (PON2 e PON3). Apesar das actividades de POase e AREase serem muito limitantes (tanto para a PON2 como a PON3), a família das PONs possui em comum a capacidade de hidrolisar lactonas aromáticas e de cadeias longas alifáticas (actividade de lactonase) (Draganov 2004, Harel 2004).

A PON3 é expressa essencialmente no fígado e nos rins (em baixos níveis), estando também associada à HDL. No entanto tanto a PON3 humana e de coelho encontram-se em concentrações muito inferiores aos níveis de PON1 (cerca de 2 ordens de magnitude). A PON2 não é detectada no soro, no entanto é expressa em vários tecidos (fígado, intestino, pulmões e rins) (Précourt 2011).

## **1.5- Electroquímica**

### **1.5.1- Conceitos teóricos**

A reacção base a ter em conta em electroquímica é o equilíbrio que existe entre duas formas (oxidada e reduzida) de uma espécie química, as quais podem ser interconvertidas através de uma transferência electrónica (Equação 1) (Kissinger 2002, Harvey 1999).



Espécie Oxidada (O) e Reduzida (R) de uma espécie química (“par redox”)

Podemos afirmar que o princípio fundamental estudado na área da electroquímica é caracterizado pelos processos de transferência electrónica que ocorrem entre a superfície de um eléctrodo e a solução adjacente, processos estes que são considerados como heterogénios (concentração do analito na interface do eléctrodo pode variar da concentração do mesmo no seio da solução) (Wang 2000, Kissinger 2002).

Existem vários passos que estão envolvidos em reacções electroquímicas: (i) transporte do analito do seio da solução para a interface do eléctrodo de trabalho, (ii) reacção de

transferência electrónica na interface do eléctrodo e (iii) a ocorrência de um processo migratório para a compensação de carga em solução, após a redução/oxidação do analito (Ticianelli 1998). Porém, a electrólise é limitada pela velocidade de transporte de massa. O transporte de massa pode ocorrer, numa célula electroquímica, de três formas diferentes: (Wang 2000, Harvey 1999)

- Migração, movimento espontâneo das espécies iónicas em solução face a uma atracção ou repulsão destas para o/pelo eléctrodo de trabalho.

- Convecção, movimento que as espécies em solução adquirem após uma deslocação mecânica provocado intensionalmente (exemplo: borbulhamento de um gás inerte na célula electroquímica  $\text{Ar}_2/\text{N}_2$ , agitação magnética, rotação do eléctrodo), ou naturalmente (através de gradientes de densidade) para o eléctrodo de trabalho.

- Difusão, movimentação de partículas provocado por um gradiente de concentração a fim de estabelecer um equilíbrio - a isotonia.

No caso da migração, a adição de uma elevada concentração de um sal facilmente ionizável e não reactivo (exemplo: KCl), ajuda não só a fluir a corrente mas também contribui para o aumento da condutividade na solução. Para minimizar os efeitos provocados pela convecção, antes de ser aplicado um potencial deve-se, se for caso, parar o borbulhento da solução (Kaifer 1999).

Todas as técnicas electroquímicas podem ser descritas em função de certas variáveis  $E$  (potencial),  $i$  (corrente) e  $t$  (tempo). As técnicas electroquímicas estão divididas em dois ramos distintos: técnicas que podem ser dinâmicas ( $i \neq 0$ ), onde é medida a intensidade de corrente face a um sinal que perturba o sistema, ou técnicas estáticas ( $i = 0$ ), onde é medido o potencial para uma corrente fixa (não ocorrendo alterações ao sistema dentro da célula electroquímica) (Harvey 1999).

### 1.5.2-Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que é baseada no conjunto dos fenómenos que ocorrem entre a interface e a superfície do eléctrodo de trabalho, assim como a camada fina presente à superfície do eléctrodo de trabalho. É definida como sendo uma técnica dinâmica uma vez que é aplicado à célula electroquímica um potencial controlado  $E$ , obtendo-se como resposta uma corrente  $i$ . O traçado do registo das correntes  $i$  em função do potencial aplicado ao sistema  $E$  denomina-se de voltamograma. Segundo critérios da IUPAC, podemos definir uma corrente catódica - valor de corrente negativo - aquando o varrimento para potenciais mais

negativos e anódica para potenciais mais positivos - valor de corrente positivo (Harvey 1999, Kissinger 2002, Ticianelli 1998, Zoski 2006).

### **1.5.3-Sistema electroquímico**

#### **1.5.3.1-Correntes faradaicas e não faradaicas**

A corrente resultante directamente de reacções redox é denominada de corrente faradaica (correntes que estão de acordo com a lei de Faraday). A intensidade de corrente  $i$  pode ser caracterizada como o número de electrões  $Q$  que irão atravessar uma certa parte de um circuito definido (interface eléctrodo-solução) por unidade de tempo  $t$  (Equação 2). Podemos então afirmar que existe uma correlação entre a medição de uma corrente faradaica e a velocidade de uma reacção química, num certo sistema (Monk 2001).

$$I_f = \frac{dQ}{dt} \quad (\text{Equação 2})$$

A intensidade de corrente faradaica ( $I_f$ ) é então expressa por  $C.s^{-1}$

No entanto, a corrente que flui dentro de uma célula electroquímica não se limita apenas a correntes faradaicas provenientes do analito: a totalidade de correntes existentes numa célula electroquímica (corrente resultante) é definida como um somatório entre as correntes faradaicas provenientes do analito em estudo e as correntes de fundo/residuais. Estas correntes residuais incluem correntes capacitivas e correntes faradaicas provenientes da electrólise de impurezas quer do electrólito quer do material do eléctrodo (Bard 2001, Kissinger 2002).

Quando se trabalha numa janela de potenciais negativos, é importante a remoção prévia do oxigénio do electrólito de suporte, uma vez que o oxigénio molecular é uma espécie electroactiva (Harvey 1999).

#### **1.5.3.2-Célula electroquímica**

Para estudar o comportamento de um analito na interface do eléctrodo/electrólito é exigido a monitorização quer do potencial, quer das corrente observadas: se se pretender estudar o comportamento de um analito no eléctrodo de trabalho, precisamos de perturbar o sistema, ou seja, tirar o sistema do seu equilíbrio. Isto pode alcançado pela polarização do eléctrodo (catodicamente ou anodicamente) ou pela simples aplicação potencial ou corrente ao eléctrodo de trabalho (Monk 2001).

Uma célula de dois eléctrodos apenas mede a corrente e a voltagem entre estes (como uma bateria). No entanto, a maioria dos ensaios electroquímicos analíticos estão interessados apenas no potencial do eléctrodo de trabalho. Através da introdução de um eléctrodo de referência (um eléctrodo cujo potencial não muda), é possível monitorizar a corrente entre o eléctrodo de trabalho e o contra eléctrodo, e a voltagem entre o eléctrodo de referência e de trabalho (Monk 2001). Na Figura 1.7 é possível observar uma célula electroquímica de três eléctrodos.

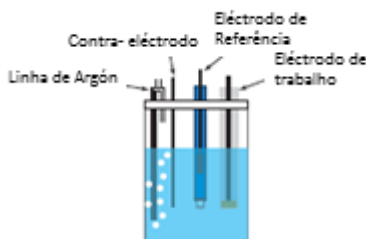


Figura 1.7: Representação esquemática de uma célula electroquímica, adaptado de Harvey 1999.

## 1.5.4-Técnicas de voltametria

### 1.5.4.1-Voltametria cíclica

Como referido na secção 1.5.2, a voltametria é uma técnica dinâmica. A técnica de voltametria cíclica (VC) é definida pela medida da passagem de corrente  $i$  aquando a variação de potencial  $E$  para duas direcções de varrimento opostas (Bard 2001). Parâmetros como a velocidade de varrimento (variação de potencial por unidade de tempo), *step potential* (variação mínima de potencial entre os vários potenciais que irão ocorrer durante o ensaio electroquímico) e a definição precisa de uma janela de potencial (onde é definido o potencial inicial, potencial de inversão e potencial final da experiência electroquímica) são parâmetros definidos *a priori* da experiência electroquímica (Bard 2001, Harvey 1999) (Figura 1.8).

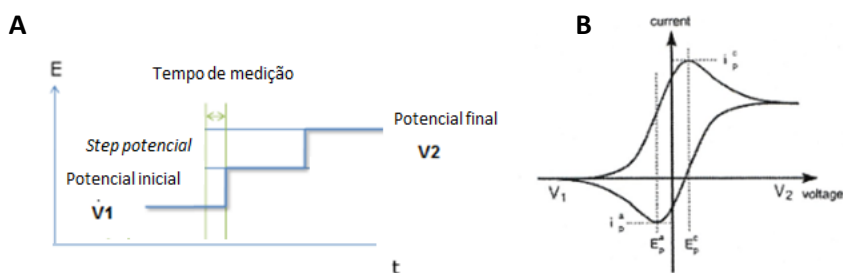
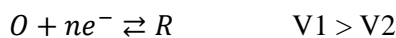


Figura 1.8: (A) Esquema do perfil geral de uma experiência de voltametria cíclica e um (B) voltamograma cíclico típico reversível.

Partindo de um potencial inicial  $V_1$  é efectuado o primeiro scan (*scan* directo) para o potencial de mudança ( $V_2$ ). No caso de  $V_1 > V_2$  (varrimento para potenciais mais negativos), o

eléctrodo torna-se num forte redutor; no caso inverso um forte oxidante ( $V1 < V2$ ). Quando, no primeiro varrimento o potencial atinge o potencial de inversão, ocorre uma mudança da direcção do *scan* para o potencial final (*scan* reverso) (Harvey 1999).



A reversibilidade depende do grau de stress imposto sobre o sistema. O processo electroquímico é considerado reversível se as espécies electroactivas são oxidadas ou reduzidas no *scan* directo, e reduzidas ou oxidadas no *scan* reverso (Figura 1.8) (Kounaves 1997). Numa reacção reversível, a concentração está relacionada com o pico de corrente  $I_p$ , indicada pela expressão de Randles-Sevcik a 25°C (Monk 2001):

$$I_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A c_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Equação 3})$$

onde  $I_p$  é a intensidade de corrente em amperes,  $c_0$  é a concentração em  $\text{mol.cm}^{-3}$ ,  $A$  é a área do eléctrodo em  $\text{cm}^2$ ,  $D$  é o coeficiente de difusão  $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$  e  $v$  é a velocidade de varrimento em  $\text{V.s}^{-1}$ .

#### 1.5.4.2-Voltametria de onda quadrada

A técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas voltamétricas mais rápida e sensível, facilitando a análise de parâmetros cinéticos de um processo electrónico. Esta técnica permite fazer uma avaliação directa de concentrações de um certo analito, sendo extremamente útil para a análise de elementos de baixas concentrações.

Considerada como uma técnica dinâmica, a VOQ utiliza, assim como a VC, uma variação de potencial para a medição de corrente. Contudo a variação de potencial ocorre na forma de onda, recorrendo a uma rampa de potencial em forma de escada (Figura 1.9) (Harvey 1999).

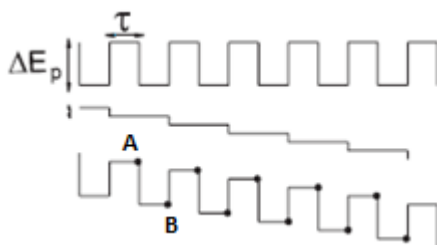


Figura 1.9:Aplicação do potencial numa experiência de VOQ (τ- tempo de pulso, ΔEp-variação de potencial).

A corrente é medida duas vezes por ciclo, ocorrendo sempre antes da mudança de direcção do potencial: uma primeira vez no final do pulso referente ao potencial directo (Figura 1.9, ponto A) e a segunda no final do pulso referente ao potencial reservo (Figura 1.9, ponto B). Cada ponto experimental corresponde à diferença de corrente medida entre o pulso directo e o reverso (Figura 1.10). Este procedimento resulta em correntes não faradaicas (capacitivas) mínimas (Harvey 1999).

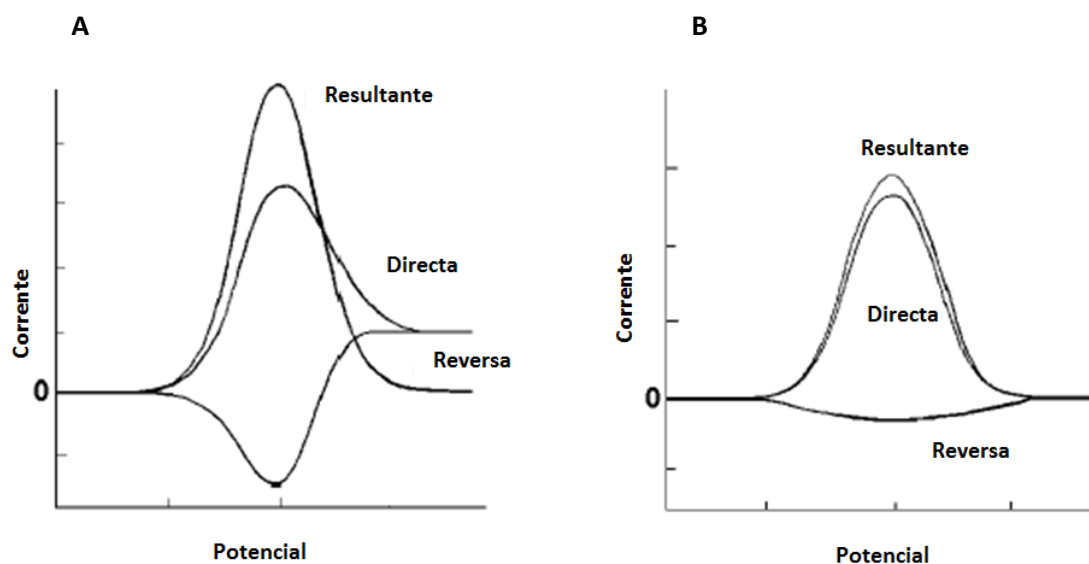


Figura 1.10: Representação esquemática geral de VOQs de um sistema (a) reversível e (b) irreversível, retirado de Souza 2003.

Numa experiência de VOQ é extremamente importante escolher uma frequência adequada, uma vez que quando estas são muito elevadas, podem influenciar a medição electroquímica, provocando elevadas correntes capacitivas. As frequências aceitáveis em VOQ estão na ordem dos 8-250 Hz.

É importante referir que, sendo uma técnica extramente sensível em relação às outras técnicas de pulso, a adsorção de reagentes/produtos numa reacção redox e/ou a detecção de impurezas podem causar um aumento significativo da corrente resultante, principalmente quando o sistema em estudo não é reversível (Monk 2001).

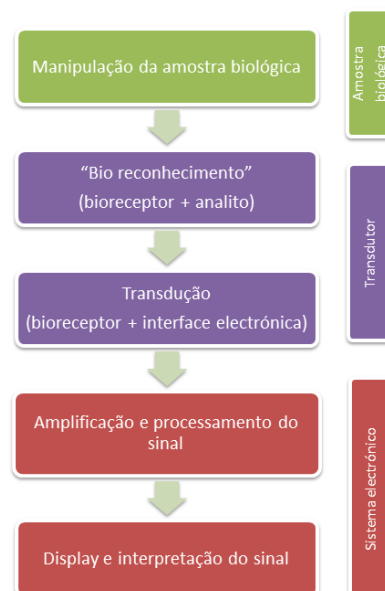
## 1.6- Desenvolvimento de um biossensor

Um biossensor é um dispositivo analítico que, através da detecção de um analito específico, é capaz de converter informação biológica num sinal electrónico, facilmente processado. Biossensores electroquímicos são uma subclasse de sensores químicos, característicos de combinar uma sensibilidade elevada com baixos limites de detecção

possuindo um elemento de reconhecimento biológico de alta especificidade (enzimas, proteínas, anticorpos, fragmentos de ácidos nucleicos, células, tecidos,...). Com base na natureza do reconhecimento biológico, os biossensores electroquímicos dividem-se em sensores catalíticos (que reconhecem o analito alvo, produzindo uma espécie electroactiva; ex: detecção de glucose, lactose e xantina) e de afinidade (biossensores não catalíticos que dependem de uma interacção selectiva entre o analito e um certo elemento biológico; ex: anticorpos, fragmento de ácidos nucleicos ou um receptor) (Ronkainen 2010).

Um transdutor pode ser facilmente definido como o transformador de um sinal resultante da interacção de bioreceptores com o analito (uma reacção/mecanismo biológico específico irá ocorrer) num sinal eléctrico. Esta interacção específica permite que a quantificação do elemento biológico que se pretende estudar seja efectuada com uma maior selectividade, sensibilidade e maior rapidez (Grieshaber 2008).

Para ser bem sucedido, um biossensor tem que usar um transdutor para converter o sinal específico num parâmetro com significado físico através de um sistema electrónico. Consequentemente, o sinal específico que advém do transdutor é posteriormente convertido num sinal electrónico, (detectado e amplificado por um circuito devidamente calibrado) através do qual é utilizado para analisar um conjunto específico de dados. Finalmente, utilizando o *software* correcto, este conjunto de dados é convertido a um parâmetro com significado físico (Grieshaber 2008). É possível observar na Figura 1.11 a composição de um biossensor.



**Figura 1.11: Composição de um biossensor e descrição dos seus processos.**



O processo de reconhecimento biológico que se pretende estudar tem que ser altamente selectivo. O bioreceptor tem de ser estável não só nas condições de armazenamento específicas para cada, mas como para certos parâmetros experimentais como o pH e temperatura, resultando em variações mínimas no sinal entre ensaios. A resposta do biossensor deve ser exacta, precisa e reprodutível: o usuário deve estar ciente do ruído de fundo, da gama de concentrações que é aceitável para um determinado estudo e ter uma compreensão completa do sistema biológico, a fim de evitar recuos na sua pesquisa. O desempenho do biossensor é geralmente avaliado remetendo também a parâmetros de sensibilidade, limite de detecção (LOD), estabilidade operacional e de armazenamento, facilidade de uso e portabilidade do mesmo (Ronkainen 2010).

## 1.7 – Objectivos

Para desenvolver um novo método analítico para caracterizar a actividade de POase e actividade de lactonase da hPON1, propõe-se neste trabalho desenhar um biossensor electroquímico que seja capaz de detectar e quantificar alguns produtos de hidrólise da hPON1.

De modo a caracterizar a actividade de POase, numa primeira fase do projecto pretende-se estudar a variação do sinal electroquímico, tanto do substrato paraoxon como do produto *p*-nitrofenol, para uma variedade de combinações de valores de pH/temperatura. Este estudo irá permitir inferir qual a combinação de parâmetros adequada para quantificar a actividade de POase da hPON1 em amostras de plasma humano.

Para o estudo da actividade de lactonase da hPON1 é pretendido a caracterização e monitorização do comportamento electroquímico da Hcy, utilizando diferentes interfaces electródicas de modo a seleccionar a modificação/interface mais apropriada para a estudo enzimático.

Como já foi referido na secção 1.2.2, actualmente existem vários métodos de quantificação de Hcy e Hcy-Tl. A longo prazo, o projecto pretende desenvolver um biossensor enzimático descartável para a determinação e quantificação rápida e *in situ* (POCT) de concentrações sanguíneas de Hcy pelo que, após a sua conclusão, será testado num cenário hospitalar na análise de fluidos biológicos como o plasma humano e a urina.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1- Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados na preparação das várias soluções tampão de pH foram as seguintes: glicina (*Sigma Aldrich*, MW=75,05g/mol; pureza 98,5%), NaOH (*Merck*, MW=40g/mol; pureza 98%), Tris (*Merck*, MW=121,14g/mol, pureza>99%), HCl (*Pronalab*, MW=36,46g/mol; pureza 37%), KCl (*Panreac*, MW=74,56g/mol, pureza 99%); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (*Merck*, MW=147,02, pureza 99,5%).

Nos ensaios electroquímicos usou-se paraoxon (*Sigma-Aldrich*, MW= 275,20g/mol, pureza>90%), *p*-nitrofenol (*Sigma-Aldrich, FLUKA*, MW=139,11g/mol), l-Hcy (*Sigma-Aldrich*, MW=135,18g/mol, pureza>98%) e l-Hcy-Tl (*Sigma-Aldrich*, MW=153,63g/mol, pureza >99%) nos respectivos valores de pH referentes a cada ensaio.

A medição de valores de pH foi efectuada utilizando um potenciómetro *Crison micro pH 2000*. Os reagentes foram pesados numa balança analítica *Mettler PJ300* e numa balança de precisão *Denver Instrument Company TR-64*.

Para os ensaios em condições anaeróbias, as soluções foram previamente borbulhadas com árgon engarrafado da *Air Liquique, Alphagaz*, onde a concentração de O<sub>2</sub> é inferior a 2ppm. Nos ensaios de controlo de temperatura, utilizou-se o termostato *Lauda Ecoline RE 104*.

As amostras de plasma humana herpanizado foram gentilmente facultadas pela Doutora Sofia Azeredo Pereira (CEDOC), onde foram conservadas a -80°C, até à sua utilização.

A água utilizada para a preparação de todas as soluções descritas possui um grau de pureza A, proveniente de sistemas Millipore MilliQ (resistividade>18,2MΩ cm<sup>-1</sup> a 25°C ).

### 2.2- Ensaio electroquímico

Os ensaios electroquímicos foram efectuados no potencióstato PGSTAT12 (*Autolab*) controlado pelo *software GPES 3.9*, utilizando um sistema de 3 eléctrodos: eléctrodos de trabalho de CV (carbono vítreo) *Radiometer* (Ø=3,14mm) e de GP (grafite pirolítica), um eléctrodo de referência Ag/AgCl (Sat. KCl) *Radiometer*, e um contra eléctrodo de fio platina *Radiometer*.

Para a execução de todos os ensaios electroquímicos foi necessário o polimento do eléctrodo de trabalho durante cerca de 3-4 minutos sobre a alumina 0,3 microns (*BUEHLER, Micropolish II*); seguindo da ultrasonicação do eléctrodo durante 5 minutos em água desionizada. Após a ultrasonicação, o eléctrodo foi lavado abundantemente com água milliq para retirar qualquer impureza sólida.

Para a quantificação do sistema *p*-nitrofenol/paraoxon, todas as experiências electroquímicas de VOQ (quantificação, ensaios enzimáticos e de controlo) foram efectuadas numa janela de potencial de [-0,3V;-1,2V], numa frequência de 25Hz; amplitude de 20mV e *step potential* de 2mV. Todos os ensaios foram realizados em 10 ml de solução tampão 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl; 2mM CaCl<sub>2</sub> ou em solução tampão 0,1M Glicina-NaOH pH 10,47; 0,2M KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, numa célula termostaticada. Foi efectuado o desarejamento prévio de 30 minutos da solução com Argon.

Todos os ensaios de VC efectuados com o sistema l-Hcy-Tl/l-Hcy foram realizados para o mesmo sistema de três eléctrodos, utilizando como eléctrodo de trabalho, um eléctrodo de CV (com pré-tratamento na solução de trabalho, pré-tratamento em 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e sem qualquer tipo de tratamento) e utilizando um eléctrodo de GP modificado (ou não) com várias interfaces (as interfaces são posteriormente relatadas aquando a apresentação de cada ensaio). Nos ensaios electroquímicos relativos aos nanotubos e nanopartículas, foi aplicado 5µl das respectivas soluções preparadas (1mg/ml; 0,5wt Nafion para os nanotubos e 1mg/ml em água milliq. para as nanopartículas de WO<sub>3</sub>) ao eléctrodo de trabalho de GP.

Todas as experiências electroquímicas envolvendo a quantificação de l-HCy e de l-Hcy-Tl no eléctrodo de trabalho de CV e de GP foram efectuadas com uma velocidade de varrimento de 50mVs<sup>-1</sup> e um *step potential* de 2mV numa janela de potencial de [-0,2V;1V;-0,2V]. As experiências electroquímicas envolvendo os nanotubos de carbono HNO<sub>3</sub>, HNO<sub>3</sub> 400, O<sub>2</sub> 500, Ureia foram efectuadas numa janela de potencial de [-0,8V;0,8V;-0,8V] e as experiências envolvendo nanopartículas WO<sub>3</sub>, filme de pátadio e platina foram efectuadas numa janela de potencial de [0V;1V;0V] (velocidade de varrimento de 50mVs<sup>-1</sup> e um *step potential* de 2mV). Em todos ensaios a célula foi desarejada previamente durante 15min, seguindo-se de vários voltamogramas de estabilização. Como electrólito de suporte, usou-se 10ml de uma solução tampão de 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl; 2mM CaCl<sub>2</sub>.

Após a execução de cada ensaio, que requeria a presença de plasma, a célula electroquímica foi limpa com lixívia e etanol. Entre cada ensaio a célula electroquímica foi repousada em lixívia sendo posteriormente lavada abundantemente com água milliq. Aquando a má conectividade ou má resposta do eléctrodo de trabalho, efectuou-se um ensaio de VC (durante 50 ciclos) numa janela de potencial de [-0,3V;-1,2V;-0,3V], para uma velocidade de varrimento de 50mVs<sup>-1</sup> e *step potential* de 5mV; numa solução de 0,5M ácido sulfúrico utilizando o mesmo sistema de três eléctrodos fixos. Para uma limpeza mais efectiva ao eléctrodo de trabalho, este foi mergulhado numa solução piranha (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3:1) após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, durante não mais que 1-2 minuto(s).

## 2.3-Ensaio enzimáticos

### 2.3.1-Obtenção de plasma humano

O plasma humano utilizado nos ensaios enzimáticos como fonte de PON1 foi adquirido de acordo com o protocolo praticado no CEDOC-Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, e que vai ao encontro com as normas e protocolos de segurança requeridos pelo Instituto Português do Sangue.

A recolha de sangue foi feita em voluntários saudáveis, em tubos de heparina-lítio, os quais foram seguidamente centrifugados a 3000g durante 15 min. Posteriormente, o plasma foi separado do *pellet* e aliquoteado. Todas as alíquotas de plasma humano foram armazenadas a -80°C, sendo apenas descongeladas imediatamente antes de cada ensaio.

### 2.3.2-Condições dos ensaios enzimáticos e de controlo

Todos os ensaios enzimáticos de actividade de POase da hPON1 foram efectuados em triplicados numa solução tampão 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl; 2mM CaCl<sub>2</sub> a 37°C, seguindo os mesmos parâmetros da quantificação do paraoxon/*p*-nitrofenol, na secção 2.2.

Efectuaram-se três ensaios de controlo para várias condições, fixando a concentração de paraoxon: (i) ensaio de estabilidade de paraoxon, realizado na presença apenas de electrólito e cálcio, (ii) ensaio de actividade residual da hPON1, realizado na presença de electrólito e de plasma e (iii) ensaio de inibição de actividade da hPON1, o qual se realizou na presença de electrólito e de 2mM EDTA .

- i) tampão 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, sem plasma humano
- ii) tampão 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl sem CaCl<sub>2</sub>, com adição de plasma humano
- iii) tampão 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl sem CaCl<sub>2</sub>, com adição de plasma humano e de 2mM EDTA

### 2.3.3-Ensaio espectrofotométricos

A actividade de POase da hPON1 foi caracterizada através da aquisição de espectros de absorvância entre 300 a 600nm (*Agilent Technologies 8453 Diode Array*) ao longo do tempo, sendo detectada a formação de *p*-nitrofenol a  $\lambda_{405nm}$ . Todos os ensaios enzimáticos reportados foram efectuados a um valor de pH 7,6 e para uma temperatura de 37°C (0,1M tampão Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl; 2mM CaCl<sub>2</sub>) num volume final de solução de 1ml, contendo 33,3µl de

plasma (fonte de hPON1). Todos os ensaios foram registados durante os primeiros 10 minutos após a adição de paraoxon.

#### **2.3.4-Ensaio electroquímico**

A actividade de POase da hPON1 foi caracterizada por VOQ numa janela de potencial de [-0,3V;-1,2V], frequência de 25Hz, amplitude de 20mV e *step potential* de 2mV. Todos os ensaios foram efectuados a um valor de pH 7,6 e para uma temperatura de 37°C (0,1M tampão tris-HCl; 0,2M KCl; 2mM CaCl<sub>2</sub>) num volume final de solução de 10ml, contendo 333µl de plasma. Todos os ensaios electroquímicos foram registados ao longo de 60 minutos após a adição de paraoxon.

Para o estudo da actividade de lactonase da hPON1 por VC, efectuaram-se ensaios a pH 7,6 (0,1M tampão Tris-HCl; 0,2M KCl; 2mM CaCl<sub>2</sub>) à temperatura ambiente para uma velocidade de varrimento de 50mVs<sup>-1</sup> e um *step potential* de 2mV. Utilizaram-se volumes diferentes de plasma (descritos aquando a apresentação dos ensaios), num volume final de solução de 10ml. Os ensaios electroquímicos foram registados ao longo de 120 minutos após a adição de Hcy-Tl.

### 3.Resultados e discussão

#### 3.1 Resposta electroquímica de *p*-nitrofenol e paraoxon-estudos de efeito de temperatura e do pH

##### 3.1.1- *p*-nitrofenol

De acordo com o descrito na secção 2.2, efectuaram-se ensaios de VOQ de modo a otimizar o sinal electroquímico de redução do grupo nitro do *p*-nitrofenol para diferentes combinações de pH (7,6 e 10,5) e de temperatura (25°C e 37°C). A Figura 3.1 mostra a variação do pico de redução do *p*-nitrofenol para uma concentração fixa de 200µM no eléctrodo de CV. Ao comparar os ensaios de VOQ efectuados (Tabela 3.1), podemos verificar que o potencial do pico catódico do *p*-nitrofenol a pH 7,6 e a 25°C é de -766mV, encontrando-se perto dos valores relatados na literatura (Tabela 3.2). A valores de pH 10,5 existe um desvio do pico catódico para potenciais mais negativos (Figura 3.1, voltamogramas c e d). Uma vez que a transferência entre prótons de moléculas orgânicas é normalmente considerada rápida, e que os prótons à superfície do eléctrodo de trabalho se encontram em equilíbrio (Luz 2004), é possível afirmar que para os ensaios efectuados a pH 7,6 (onde existe uma maior concentração de prótons do que nos ensaios efectuados a pH 10,5); o grupo nitro do *p*-nitrofenol é mais facilmente reduzido, explicando a diminuição do valor de potencial absoluto do pico catódico do *p*-nitrofenol a valores de pH mais ácidos (Tabela 3.2:  $E_{\text{pH } 7,6} < E_{\text{pH } 10,5}$  ).

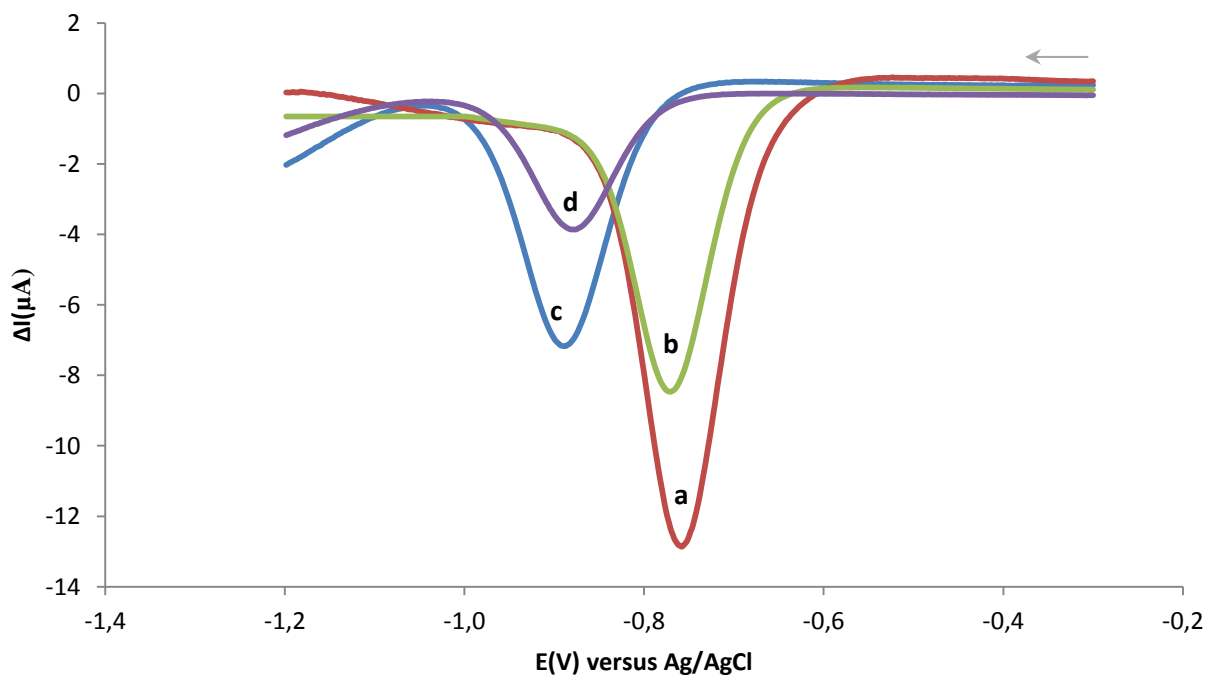


Figura 3.1: Resposta electroquímica por VOQ a uma concentração fixa de *p*-nitrofenol (200µM), para combinações de pH (a e b, pH 7,6; c e d, pH 10,5) e de temperatura (b e d, T=25°C; a e c, T=37°C) num eléctrodo de trabalho de CV.

**Tabela 3.1:** Valores de potencial do pico de *p*-nitrofenol obtidos em ensaios de VOQ a diferentes pH e temperaturas .Os ensaios foram realizados com um eléctrodo de carbono vítreo com uma concentração de *p*-nitrofenol de 200µM.

Temperatura (°C)	25		37	
Valor de pH	7,6	10,5	7,6	10,5
E (mV)	-766	-873	-758	-893
I <sub>c</sub> (µA)	-8,46	-3,86	-12,9	-7,17

Apesar de existir uma grande variedade de estudos electroquímicos onde é quantificado o *p*-nitrofenol (a potenciais inferiores aos observados neste trabalho) estes concentram-se nas melhores condições para a quantificação do mesmo. De modo a aumentar a sensibilidade para o *p*-nitrofenol, nestes estudos utilizaram-se vários tipos de modificação da superfície dos eléctrodos de trabalho (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2:**Estudos de quantificação de *p*-nitrofenol utilizando diferentes eléctrodos de trabalho com modificações de superfície.

Sistema electroquímico (eléctrodo de trabalho)	Experiência electroquímica (versus Ag/AgCl)	Condições de electrólito/pH	Referência
Eléctrodo de carbono vítreo com tetracianoetileno de lítio	VC (-0,65V)	pH=4.5 em tampão de Mackllvaine.	(Luz 2004)
Eléctrodo de carbono vítreo modificado com materiais de carbono poroso contendo nanoparticulas de paládio	VC (-0,70V)	pH=5, em tampão acetato	(Veerakumar 2014)
Eléctrodo de CV modificado com compósito poli(difenilamina)/MWCNT	VC(0,71V)	pH=7, em tampão PBS	(Yang 2011)
Eléctrodo de GP modificado com carbonos activados.	VC (-0,63V)	pH=5, em tampão acetato	(Madhu 2014)
Eléctrodo de CV	VOQ (0,76V)	pH=7,6, em tampão trís HCl	Este trabalho

É possível também constatar que entre as duas temperaturas estudadas (25°C e 37°C), o valor absoluto da intensidade de corrente do pico catódico varia consideravelmente (Tabela 3.1), aumentando com o aumento da temperatura. Apesar de não haver estudos sobre o efeito da temperatura na quantificação do *p*-nitrofenol através de experiências electroquímicas, é possível inferir que, para valores de temperatura mais elevados, a intensidade de corrente será também mais elevada (Wildgoose 2004).

### 3.1.2- Paraoxon

De seguida, a resposta electroquímica do paraoxon foi estudada nas mesmas condições experimentais utilizadas com o *p*-nitrofenol. Ao comparar os ensaios de VOQ efectuados com o paraoxon e o *p*-nitrofenol, observamos que o potencial absoluto do pico catódico do paraoxon



para todas as condições estudadas é menor, concluindo-se que a reacção de redução deste composto é mais favorecida que a redução do *p*-nitrofenol (nestas condições experimentais).

A valores de pH 10,5 (para ambas as temperaturas) existe um desvio do pico catódico do paraoxon para potenciais mais negativos relativamente a pH 7,6 (Figura 3.2 e Tabela 3.3), porém esta variação não é muito significativa (pH 10,5;  $E_{25^{\circ}\text{C}} = -651\text{mV}$ ,  $E_{37^{\circ}\text{C}} = -632\text{mV}$ ; pH 7,6  $E_{25^{\circ}\text{C}} = -631\text{mV}$ ,  $E_{37^{\circ}\text{C}} = -623\text{mV}$ ).

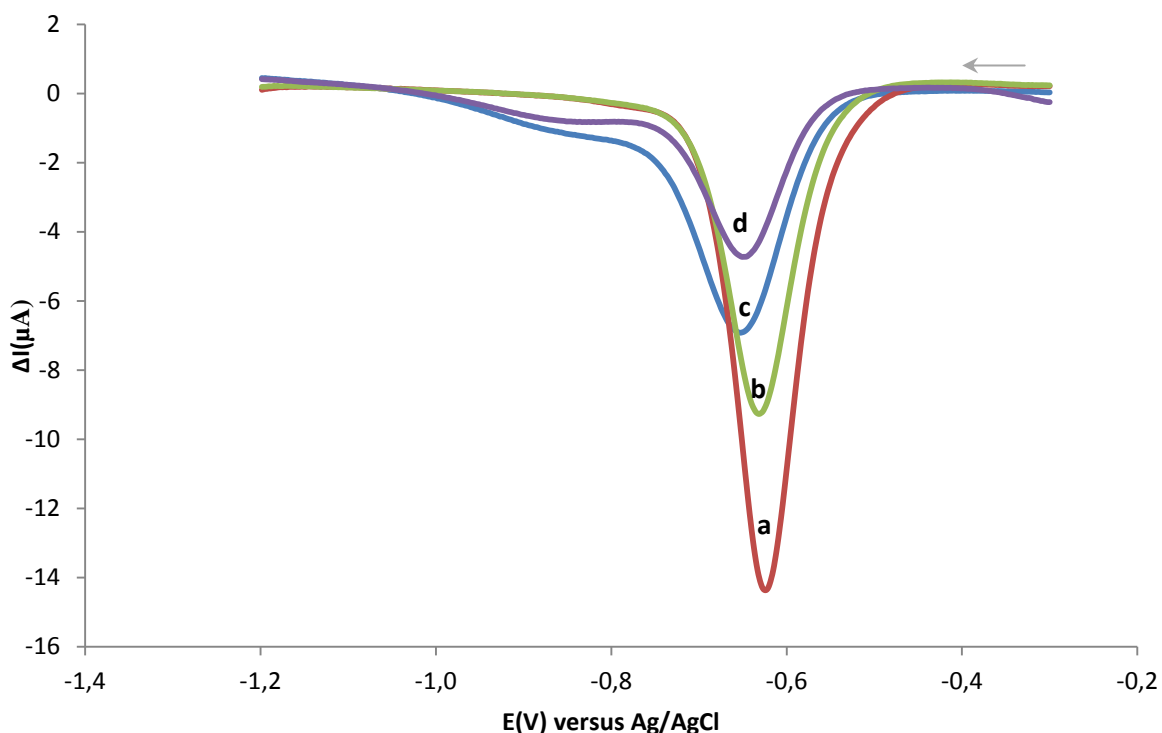


Figura 3.2: Resposta electroquímica por VOQ a uma concentração fixa de paraoxon ( $200\mu\text{M}$ ), para combinações de pH (a e b, pH 7,6; c e d, pH 10,5) e de temperatura (b e d,  $T=25^{\circ}\text{C}$ ; a e c,  $T=37^{\circ}\text{C}$ ) num eléctrodo de trabalho de CV.

Tabela 3.3: Valores de potencial do pico de paraoxon obtidos em ensaios de VOQ a diferentes pH e temperaturas. Os ensaios foram realizados com um eléctrodo de carbono vítreo com uma concentração de paraoxon de  $200\mu\text{M}$ .

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	25		37	
Valor de pH	7,6	10,5	7,6	10,5
E (mV)	-631	-651	-623	-632
$I_c$ ( $\mu\text{A}$ )	-9,268	-4,723	-14,361	-6,919

Entre as duas temperaturas estudadas ( $25^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ ), a intensidade do pico varia consideravelmente, verificando-se que a detecção de paraoxon em eléctrodos de carbono vítreo é mais sensível a temperaturas de  $37^{\circ}\text{C}$  para os valores de pH (Tabela 3.3).

Como foi reportado por Ceron 2014 *et al.* e por Dias 2014 *et al.*, a actividade óptima de POase da hPON1 é observada a pH 10,5 e a 37°C. Contudo, é importante salientar que a pH 10,5 existe um sinal electroquímico na janela de potenciais de -780mV a -900mV (Figura 3.2) que pode ser devido à degradação química do paraoxon em *p*-nitrofenol (ver secção 3.1.1), não sendo adequada/correcta a quantificação da actividade de POase da hPON1 a este valor de pH. O aumento de temperatura (25°C para 37°C), não tem influência no sinal electroquímico (a ambos os valores de pH) pelo que se concluiu que a 37°C não ocorre degradação química do paraoxon.

De acordo com estes resultados optou-se realizar a quantificação da actividade de POase da hPON1 a pH 7,6 e a 37°C: nestas condições experimentais é possível inferir que qualquer variação de corrente na janela de potenciais de -740mV a -770mV, encontra-se directamente relacionado com a conversão de paraoxon a *p*-nitrofenol.

### 3.2-Estudo da influência da variação de frequência do varrimento de potencial

De forma a caracterizar a resposta electroquímica do *p*-nitrofenol nos eléctrodos de CV, efectuou-se um estudo em VOQ onde se variou a frequência aplicada (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100Hz). Este estudo foi realizado para um valor de pH 7,6 e à temperatura de 25°C, fixando a concentração de *p*-nitrofenol (100µM).

Foi possível constatar que existe uma linearidade entre a variação de corrente do pico de redução do *p*-nitrofenol ( $\Delta I$ ) e a frequência (Figura 3.3, *incidência*) e entre o potencial do pico de redução ( $E$ ) e o logaritmo da frequência aplicada ( $\log f$ ) (Equação 4) (Scholz 2010) .

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = - \frac{2,3RT}{\alpha nF} \quad (\text{Equação 4})$$

Assim, e de acordo com o primeiro critério referido anteriormente, podemos afirmar que a redução do *p*-nitrofenol é um processo totalmente irreversível e que é controlado por adsorção das espécies na superfície do eléctrodo (Figura 3.3, *incidência*) (O'Dea 1993).

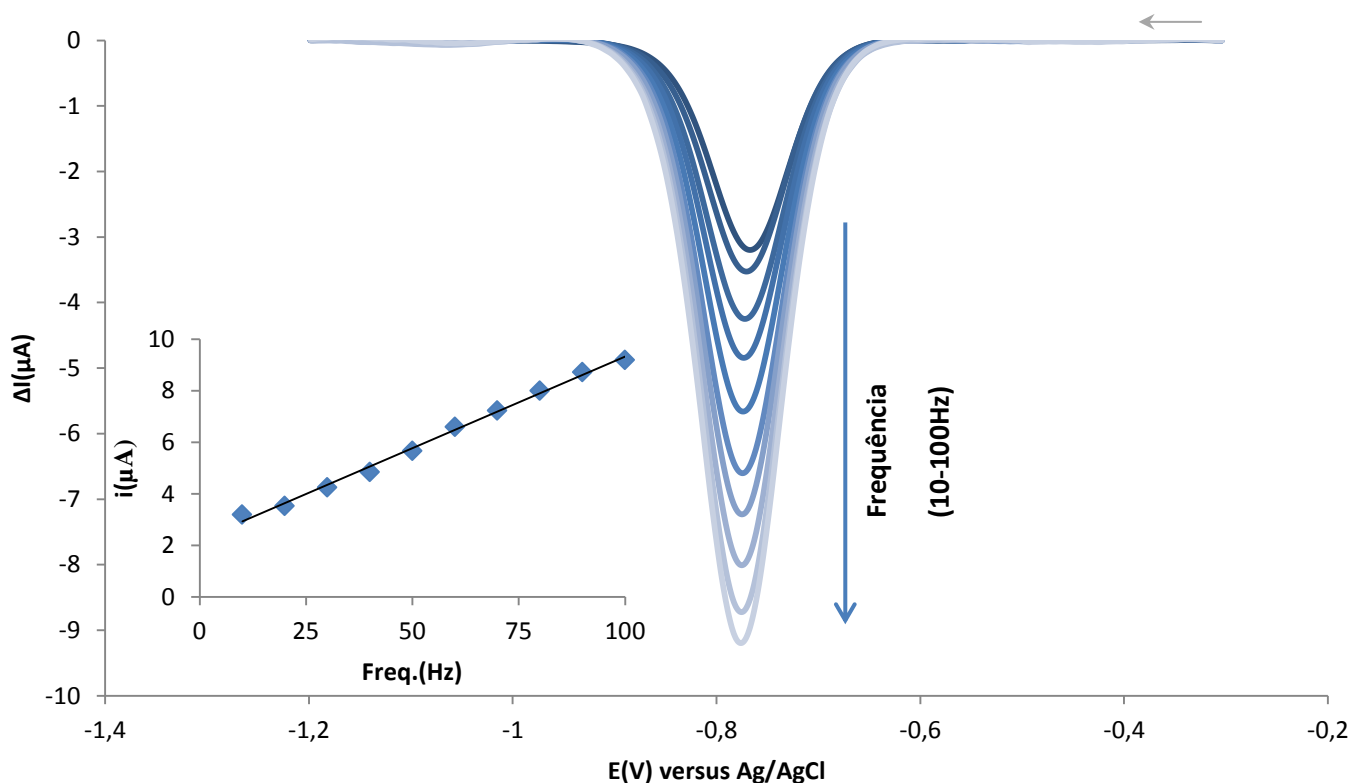


Figura 3.3: Efeito da variação de frequência de varrimento de potencial do voltamograma de onda quadrada na redução de *p*-nitrofenol a pH 7,6 á temperatura ambiente para um concentração fixa de 100 $\mu$ M (10 até 100Hz), num eléctrodo de trabalho de CV. Incidência: Variação de corrente do pico catódico com a frequência aplicada ( $y=0,071x+2,215$ ;  $R^2=0,995$ ).

Segundo o critério de reversibilidade na equação 4, onde  $\alpha$  é o coeficiente de transferência,  $n$  o número de electrões envolvidos na reacção e as variáveis  $R$  (8,314462 mol C<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $T$  (298,15 K) e  $F$  (96485,34 C mol<sup>-1</sup>) possuem o seu significado usual, podemos deduzir o valor de  $\alpha n$  para o *p*-nitrofenol (Figura 3.4).

No estudo efectuado à oxidação do grupo *p*-nitrofenol efectuado por Pedrosa *et al.*(2003), o cálculo de  $\alpha n$  (uma vez comprovada a irreversibilidade da oxidação de *p*-nitrofenol) foi de 1.92, envolvendo 2 electrões por molécula de *p*-nitrofenol (sabendo à priori que o valor de  $\alpha$  é superior a 0,5 para a maioria das moléculas orgânicas) (O'Dea 1993). Neste trabalho o valor de  $\alpha n$  calculado para a redução do grupo *p*-nitrofenol é de 4,31. Este valor parece encontrar-se correcto uma vez que, como foi anteriormente referido, a redução do grupo nitro do *p*-nitrofenol envolve 4 electrões.

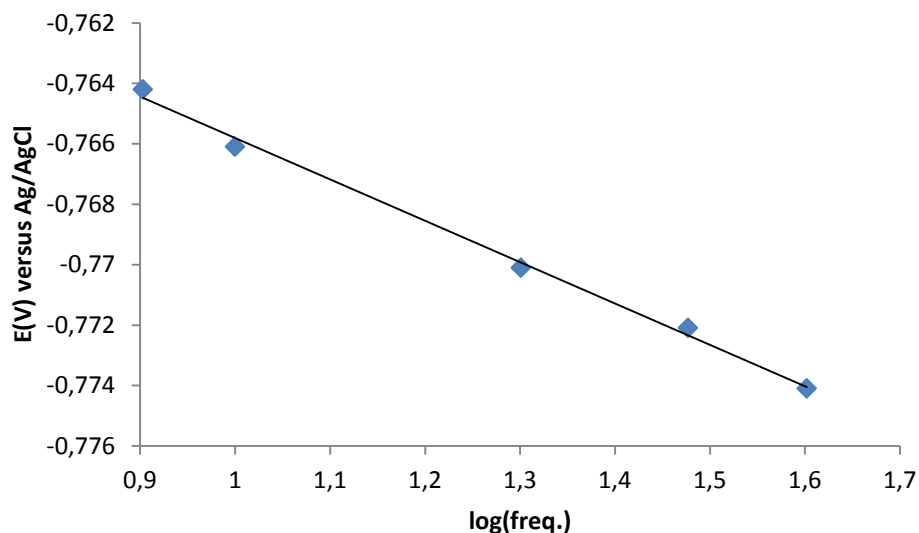


Figura 3.4: Dependência linear do potencial do pico com o logaritmo da frequência aplicada para uma concentração fixa de 100  $\mu\text{M}$  *p*-nitrofenol a pH 7,6 à temperatura ambiente ( $y = -0,014x - 0,752$ ;  $R^2 = 0,996$ ) num eléctrodo de trabalho de CV.

Efectuaram-se estudos de variação de frequência nas mesmas condições fixando a concentração de paraoxon (100 $\mu\text{M}$ ), no entanto os parâmetros avaliados não possuem qualquer relação linear, pelo que pode ser classificado como um “sistema quase reversível” (resultados não mostrados) (O'Dea 1993).

### 3.3-Quantificação de paraoxon e *p*-nitrofenol por voltametria de onda quadrada

Após o estudo do efeito do pH e da temperatura na detecção de *p*-nitrofenol e paraoxon por VOQ fez-se variar a concentração destes compostos na célula electroquímica. A partir dos voltamogramas registados para as diferentes concentrações foi determinado o valor da intensidade do pico catódico.

Na Tabela 3.4 encontram-se equações de ajuste às curvas de calibração traçadas de acordo com a variação da intensidade de corrente em função da concentração de *p*-nitrofenol/paraoxon. Para cada combinação de pH e temperatura foi calculada a sensibilidade (determinada pelo declive da curva de calibração em função da área do eléctrodo de trabalho de CV, Área=0,077  $\text{cm}^2$ ) e os limites de detecção ( $3\sigma$ /declive da linearização, onde  $\sigma$  é o desvio padrão do sinal medido para a concentração mais baixa de analito que se obteve na recta de calibração).

**Tabela 3.4:** Comparação de parâmetros analíticos referentes à calibração do paraoxon e *p*-nitrofenol para as várias combinações de pH (7,6 e 10,5) e de temperatura (25 °C e 37°C), utilizando o eléctrodo de CV como eléctrodo de trabalho.

	pH	Temperatura (°C)	Gama de linearidade	$i(\mu\text{A}); [\text{Paraoxon}/p\text{-nitrofenol}](\mu\text{M})$	$R^2$	Sensibilidade( $\text{A.M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ )	Limite de detecção( $\mu\text{M}$ )
<b><i>p</i>-nitrofenol</b>	7,6	25	1-400 $\mu\text{M}$	$0,032x+0,191$	0,998	0,417	0,476
		37	1-400 $\mu\text{M}$	$0,055x+0,362$	0,998	0,705	0,136
	10,5	25	1-500 $\mu\text{M}$	$0,022x+0,142$	0,998	0,282	0,340
		37	1-500 $\mu\text{M}$	$0,033x+0,199$	0,997	0,426	0,031
<b>Paraoxon</b>	7,6	25	1 -500 $\mu\text{M}$	$0,046x+0,510$	0,996	0,590	0,289
		37	1 -500 $\mu\text{M}$	$0,068x+0,777$	0,997	0,884	0,738
	10,5	25	1 -500 $\mu\text{M}$	$0,037x+0,229$	0,992	0,475	0,450
		37	5 -500 $\mu\text{M}$	$0,027x+0,475$	0,995	0,345	1,682

Na literatura encontra-se descrito que a temperatura óptima para a actividade POase como substrato encontra-se entre 30°C a 45°C (Golmanesh 2008), no entanto não é recomendando efectuar ensaios a temperaturas superiores a 37°C uma vez que pode aumentar a hidrólise não enzimática do paraoxon (Ceron 2014, Dias 2014).

Apesar de na literatura a actividade óptima da paraoxonase ser uma combinação de valores de pH 10,5 a temperaturas de 37 °C, verificou-se que para este valor de pH (para ambas as temperaturas estudadas) existe uma degradação química de paraoxon em *p*-nitrofenol (secção 3.1.2). Como tal, neste trabalho tentou encontrar-se um compromisso entre os dois parâmetros experimentais estudados: é possível observar que a pH 7,6 e a temperaturas de 37 °C existe uma maior sensibilidade de detecção quer de paraoxon quer de *p*-nitrofenol (*p*-nitrofenol, sensibilidade<sub>pH=7,6</sub>=0,705  $\text{A.M}^{-1}\text{cm}^{-2}$  > sensibilidade<sub>pH=10,5</sub>=0,426  $\text{A.M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ; paraoxon, sensibilidade<sub>pH=7,6</sub>=0,884  $\text{A.M}^{-1}\text{cm}^{-2}$  > sensibilidade<sub>pH=10,5</sub>=0,345  $\text{A.M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ). Este resultado é favorável para a quantificação de *p*-nitrofenol e paraoxon, uma vez que, como verificado na secção 3.1.1 e 3.1.2., não existe degradação química de paraoxon em *p*-nitrofenol com a combinação dos parâmetros de pH 7,6 e temperatura 37°C.

As curvas de calibração apresentadas de seguida são referentes à quantificação de *p*-nitrofenol e paraoxon para pH 7,6 e à temperatura de 37°C (Figura 3.5), condições em que foram efectuados os ensaios enzimáticos (apresentados posteriormente).

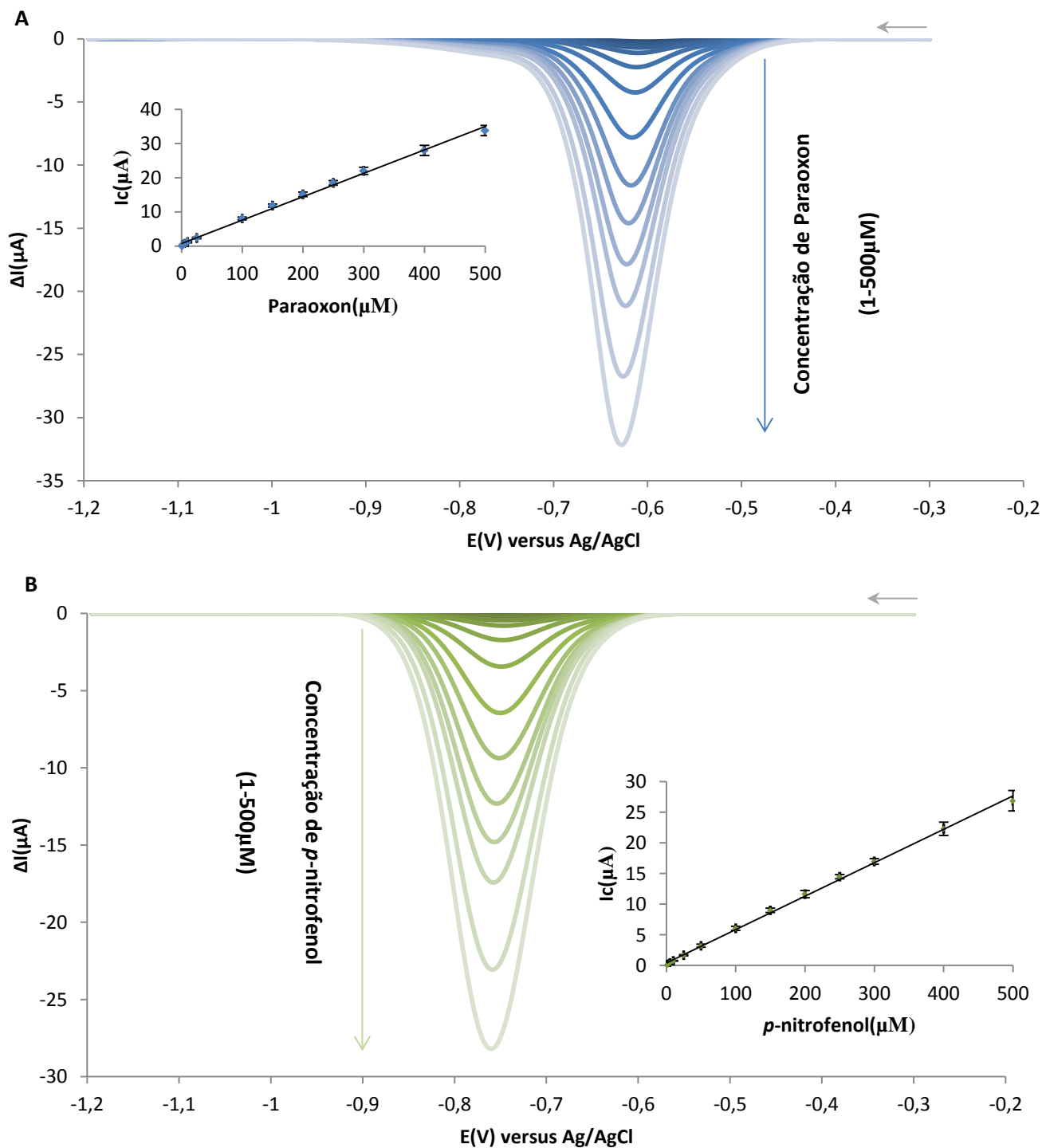


Figura 3.5: Quantificação de (A) paraoxon e (B) *p*-nitrofenol a um valor de pH=7,6 e a uma temperatura de 37°C, por ensaios electroquímicos de VOQ. Incidência: Dependência linear da variação de corrente em relação a concentrações crescentes de (a) paraoxon ( $y=0,068+0,777x$ ;  $R^2=0,997$ ) e de (b) *p*-nitrofenol ( $y=0,055+0,362x$ ;  $R^2=0,998$ ) e respectivo desvio padrão.

### **3.4-Ensaio enzimático da actividade de POase da hPON1 por VOQ**

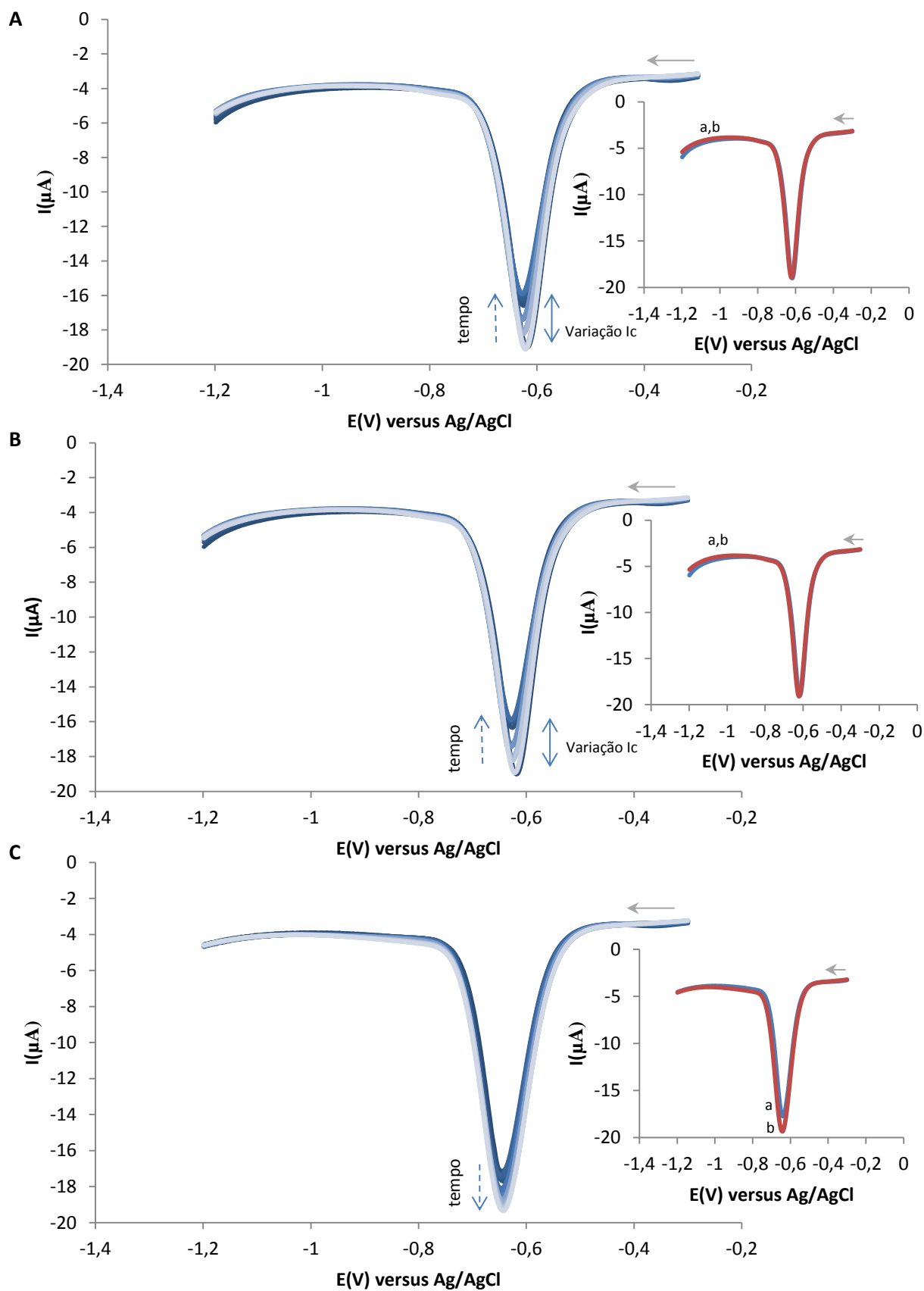
#### **3.4.1-Estudos controlo**

Como foi referido anteriormente na secção 2.3.2, efectuaram-se três ensaios controlo nomeadamente o ensaio de estabilidade da resposta electroquímica de paraoxon, o ensaio de actividade residual da hPON1e o ensaio de inibição da actividade de POase mediante a adição de EDTA. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.6.

É possível verificar que, para todos os ensaio controlo, ocorre uma variação não consistente do sinal electroquímico do paraoxon nos primeiros 30 minutos. A partir deste intervalo de tempo, o sinal estabiliza retornando o valor inicial (excepto no ensaio de inibição, onde o valor absoluto da intensidade de corrente tende a aumentar, não se tendo até à data desta tese, encontrado uma explicação para este fenómeno).

Na ausência de cálcio (ensaio de actividade residual) não existe actividade de POase da hPON1. É necessário a adição de uma fonte externa de cálcio para que se observe a actividade de POase da hPON1 (reportado posteriormente na secção 3.4.2).

É possível concluir que para os ensaios controlo efectuados, apesar de variar a resposta electroquímica referente ao paraoxon, não existe nenhuma degradação química/formação de *p*-nitrofenol, sendo esta condição favorável para o estudo cinético da actividade de POase da hPON1 a partir da formação de *p*-nitrofenol.



**Figura 3.6:** Voltamogramas de onda quadrada relativos aos ensaios controlo de (A) estabilidade (200  $\mu\text{M}$  paraoxon na ausência de plasma), (B) de actividade residual (200  $\mu\text{M}$  paraoxon, sem adição de cálcio, na presença de plasma) e (C) de inibição por EDTA (200  $\mu\text{M}$  paraoxon, com adição de EDTA, na presença de plasma) observados a pH 7,6 e a 37°C utilizando um eléctrodo de trabalho de CV. *Incidência:* Voltamogramas relativos ao (a) tempo inicial e (b) ao fim de 60 minutos dos respectivos ensaios.



### 3.4.2-Actividade enzimática

Na Figura 3.7 está representado o ensaio enzimático para a caracterização da actividade de POase da hPON1 no plasma efectuado às condições impostas anteriormente (compromisso entre o pH 7,6 à temperatura de 37°C). Nestes ensaios é possível observar claramente a formação de *p*-nitrofenol e o consumo simultâneo de paraoxon em função do tempo do ensaio.

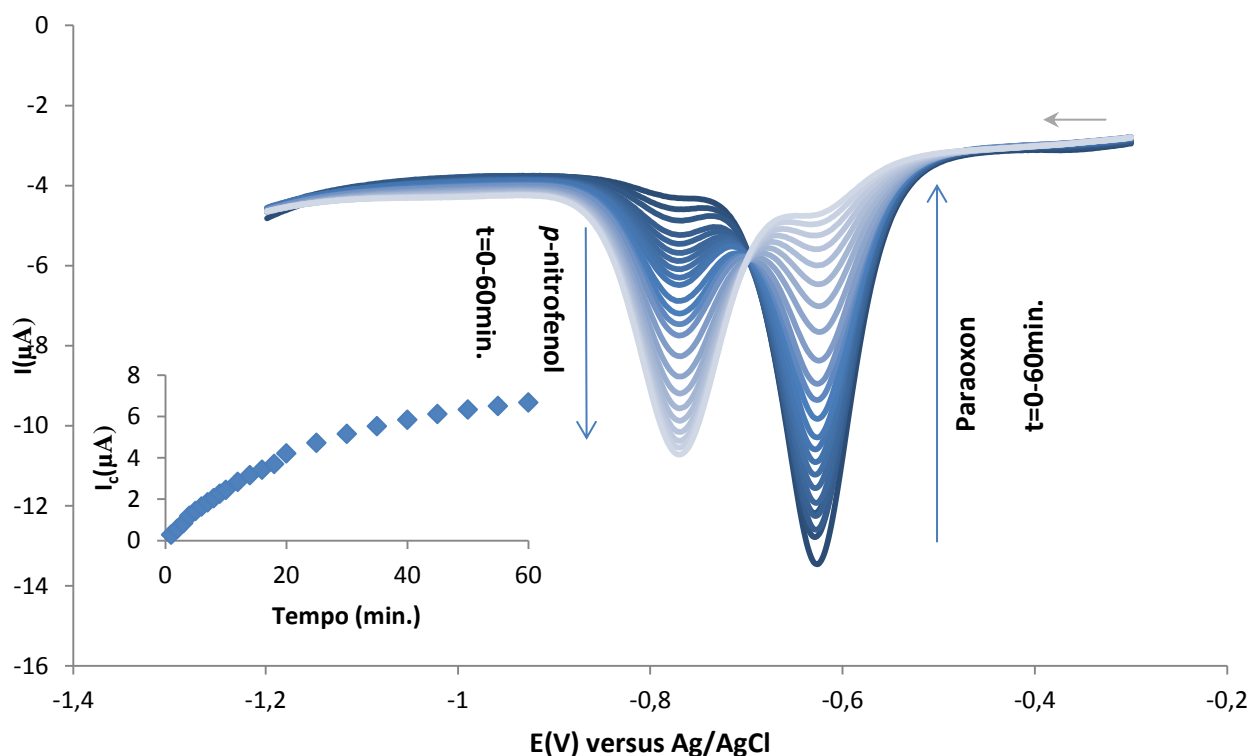


Figura 3.7: Ensaio enzimático por VOQ efectuado a pH 7,6 e a 37°C para uma concentração fixa de 200 $\mu\text{M}$  de paraoxon. Incidência: Intensidade de corrente referente ao sinal electroquímico produzido pelo *p*-nitrofenol ao longo do tempo.

Após a execução de ensaios em triplicado para várias concentrações de paraoxon testadas, procedeu-se então à avaliação dos parâmetros cinéticos da actividade de POase da hPON1 (Figura 3.8). Os valores de intensidade de corrente relativos à formação de *p*-nitrofenol foram convertidos em concentração de produto formado. Todos os ensaios foram seguidos durante 60 minutos, no entanto o cálculo da velocidade inicial de formação do *p*-nitrofenol ( $v_0$ ) é referente apenas aos 10 minutos iniciais da reacção. É de salientar que só é viável fazer a avaliação para a formação de *p*-nitrofenol uma vez que, como descrito na secção 3.4.1, observou-se sempre uma pequena instabilidade do sinal electroquímico de paraoxon ao longo do tempo.

A Figura 3.8 mostra a relação entre a velocidade inicial de formação do *p*-nitrofenol para uma concentração de paraoxon. Foi possível obter os parâmetros cinéticos referentes à constante de Michaelis ( $K_m=1,3 \pm 0,3\text{mM}$ ) e à velocidade máxima da reacção enzimática ( $V_{\text{max}}=31 \pm 3\mu\text{M min}^{-1}$ ), utilizando o software *graphpad prism* para o ajuste dos dados.

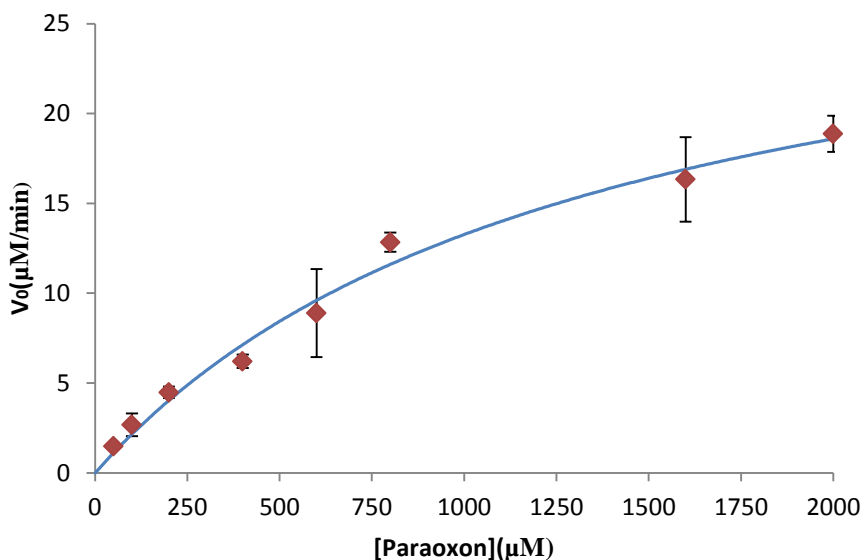


Figura 3.8: Variação da velocidade inicial da reacção de POase da hPON1 do plasma nos ensaios enzimáticos por VOQ com a concentração de paraoxon. Ajuste dos dados segundo uma regressão não linear de acordo com a equação de Michaelis-Menten ( $K_m=1,3 \pm 0,3\mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}}=31 \pm 3\mu\text{M min}^{-1}$ ;  $R^2=0,987$ ), onde cada ponto corresponde à média de 3 ensaios e a barra de erro corresponde ao desvio padrão. Os ensaios foram efectuados a pH 7,6 e a 37°C.

### 3.5-Estudo da actividade de POase de hPON1 por espectroscopia Uv-Vis

#### 3.5.1-Ensaio controlo

Uma vez que apenas o *p*-nitrofenol é observado no espectro visível a 405nm, os ensaios espectrofotométricos da actividade de hPON1 foram seguidos através da variação da absorbância a 405nm. Como foi referido anteriormente, a caracterização da actividade de POase da hPON1 requer a execução de ensaios de controlo.

Na Figura 3.9 é possível observar os espectros Uv-Vis dos vários controlos efectuados ao fim de 10 minutos de ensaio.

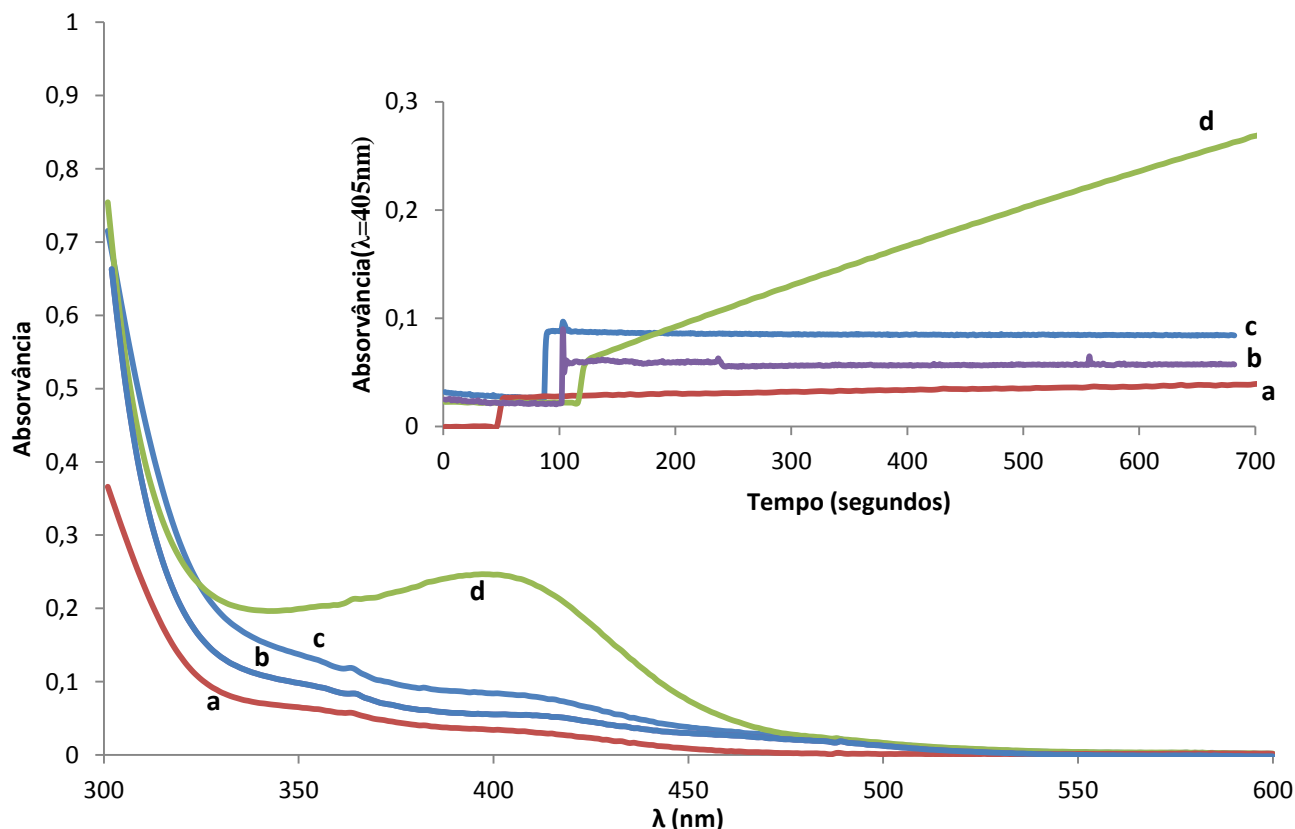


Figura 3.9: Espectro de absorvância relativo aos ensaios de controlo e de actividade enzimática (nas condições impostas como óptimas nos ensaios electroquímicos) ao fim de 10 minutos. *Incidência:* Absorvância a  $\lambda_{405\text{nm}}$  dos vários ensaios de controlo: (a) Ensaio de estabilidade; (b) Ensaio de actividade residual de POase da hPON1; (c) Ensaio de inibição da actividade de POase da hPON1; (d) Ensaio da actividade enzimática de POase da hPON1.

Assim como nos ensaios por electroquímica, na espectroscopia Uv-Vis efectuaram-se os mesmos três ensaios de controlo. O ensaio de estabilidade (Figura 3.9, *incidência a*) foi corrido durante 60 segundos antes da adição de paraoxon ( $200\mu\text{M}$ ) para verificar a estabilidade da resposta ( $A_{405\text{nm}} \approx 0$ ). Após a adição de paraoxon, foi possível observar um aumento imediato de absorvância a  $405\text{nm}$  ( $A_{405\text{nm}} = 2,52 \times 10^{-2}$ ) mantendo-se depois constante até ao fim do ensaio.

Para os restantes ensaios, adicionou-se a mesma quantidade de plasma, pelo que é possível observar que a absorvância do primeiro patamar é semelhante (Figura 3.9, *incidência b*,  $A_{405\text{nm}} = 2,91 \times 10^{-2}$ ; *incidência c*,  $A_{405\text{nm}} = 2,27 \times 10^{-2}$ ; *incidência d*,  $A_{405\text{nm}} = 2,65 \times 10^{-2}$ ). Tanto no ensaio de actividade residual de POase da hPON1 (Figura 2.9, *incidência b*) assim como no ensaio de inibição (Figura 3.9, *incidência c*), podemos observar que após a estabilização no patamar inicial de absorvância referente à adição de plasma, aquando a adição de paraoxon ocorre um aumento de absorvância atingindo-se então um segundo patamar. É possível afirmar que, como foi demonstrado anteriormente pelos ensaios electroquímicos, que a hPON1 não tem actividade de POase/ou esta é insignificante sem a adição de cálcio.

No ensaio enzimático (nas condições experimentais utilizadas nos ensaios electroquímicos) verificou-se que após a estabilização do primeiro patamar, e consequente

adição de paraxon (200 $\mu$ M) observou-se um aumento da absorvância a 405nm ao longo do tempo (Figura 3.9, *incidência d*).

### 3.5.2-Actividade enzimática

Após a execução dos ensaios de controlo, prosseguiu-se à quantificação do *p*-nitrofenol formado ao longo do tempo, isto é a velocidade da reacção enzimática. A conversão da absorvância registada em concentração de *p*-nitrofenol foi efectuada através do coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol,  $\epsilon_{405\text{nm}} \text{ } p\text{-nitrofenol} = 18,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nankai 2002, Kitamura 2007). Na Figura 3.10 é possível observar a medição da absorvância a  $\lambda_{405\text{nm}}$  e respectiva conversão à concentração de *p*-nitrofenol formado (Figura 3.10, *incidência*) para uma concentração inicial de paraoxon de 200 $\mu$ M.

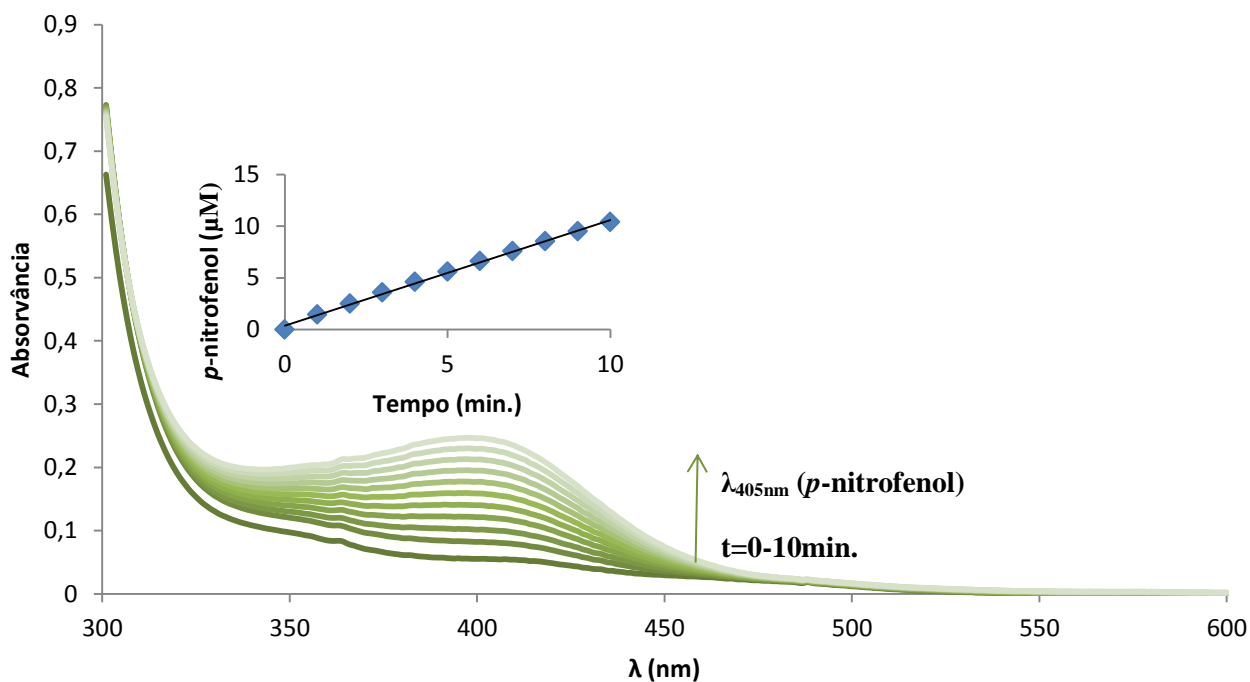


Figura 3.10: Variação do sinal do *p*-nitrofenol verificado a  $\lambda_{405\text{nm}}$  em espectroscopia Uv-Vis. *Incidência:* Conversão da absorvância verificada em concentração de *p*-nitrofenol ( $y=1,019x+0,386$ ;  $R^2=0,997$ ).

Após a execução de triplicados para as várias concentrações estudadas, procedeu-se então à avaliação dos parâmetros cinéticos da actividade de POase da hPON1 (Figura 3.11) nomeadamente à constante de Michaelis ( $K_m=0,43 \pm 0,09\text{mM}$ ) e à velocidade máxima da reacção enzimática ( $V_{\text{max}}=4,7 \pm 0,4 \mu\text{M min}^{-1}$ ), utilizando o software *graphpad prism* para o ajuste dos dados.

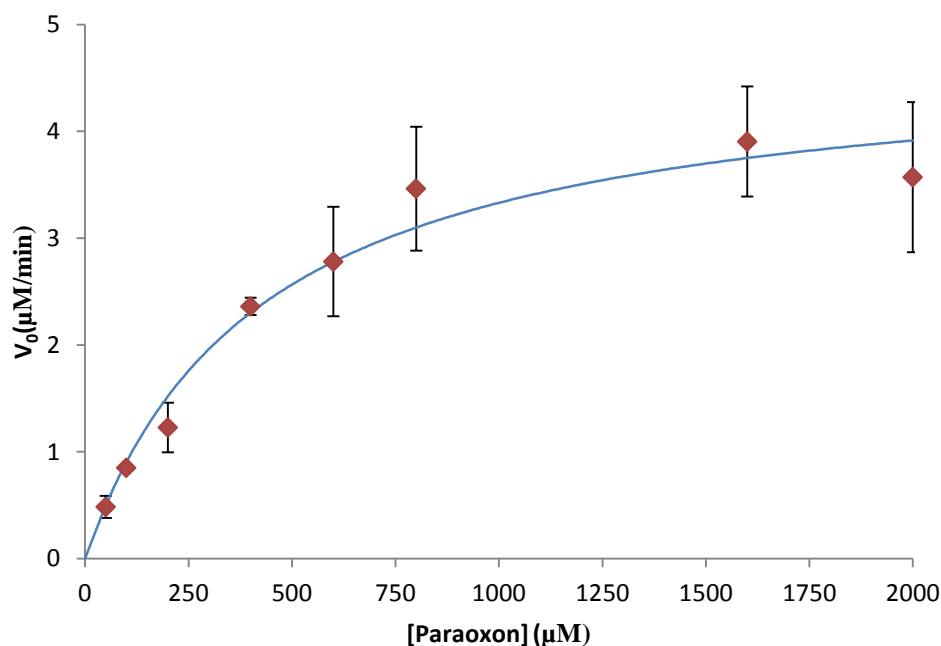


Figura 3.11: Variação da velocidade inicial da reacção de POase da hPON1 do plasma nos ensaios enzimáticos por espectroscopia Uv-Vis com a concentração de paraoxon. Ajuste dos dados segundo uma regressão não linear de acordo com a equação de Michaelis-Menten ( $K_m=0,43 \pm 0,09\text{mM}$ ,  $V_{\max}=4,7 \pm 0,4\mu\text{M min}^{-1}$ ;  $R^2=0,970$ ), onde cada ponto corresponde à média de 3 ensaios e a barra de erro corresponde ao desvio padrão. Os ensaios foram efectuados a pH 7,6 e a 37°C.

### 3.6-Comparação das actividades de POase de hPON1 por ensaios electroquímicos de VOQ e por espectroscopia Uv-Vis

Após a avaliação da actividade de POase de hPON1 em ensaios electroquímicos por VOQ e por espectroscopia Uv-Vis é possível verificar uma disparidade entre as actividades enzimáticas observadas. Na literatura, até ao momento da execução deste projecto, não foi encontrado nenhum estudo electroquímico de VOQ que seguisse a actividade de POase da hPON1 para poder efectuar uma comparação. No entanto é possível encontrar na literatura estudos que seguem a actividade de POase da PON1 por espectroscopia Uv-Vis.

Segundo Brushia *et al.*, a actividade de POase da hPON1 foi quantificada monitorizando a hidrólise do paraoxon a *p*-nitrofenol em espectroscopia Uv-Vis a  $\lambda_{405\text{nm}}$ , utilizando um valor de pH 8, obtendo-se um valor de  $K_m=1,4\pm0,1\text{mM}$ . (Brushia 2001). Golmanesh *et al.*, efectuou uma purificação à hPON1 e posteriormente monitorizou a actividade de POase a  $\lambda_{412\text{nm}}$  para um valor de pH 8,5 obtendo um valor de  $K_m=1,2\pm0,2\text{mM}$  (Golmanesh 2008). Encontra-se também descrito por Khersonsky *et al.* parâmetros cinéticos da variante recombinante PON1 G2E6 (rePON1-possuindo 86% de homologia com a hPON1) para vários

fosfotriesteres, entre os quais foi medido a hidrólise de paraoxon a  $\lambda_{405\text{nm}}$ , tendo um valor de  $K_m=0,8\pm0,1\text{mM}$  (Khersonsky 2005).

O ajuste dos dados segundo uma regressão não linear de acordo com a equação de Michaelis-Menten revelou valores de  $V_{\text{max}}$  e  $K_m$  superiores nos ensaios electroquímicos (Electroquímica:  $V_{\text{max}}=31\pm3\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $K_m=1,3\pm0,3\text{mM}$ ; Uv-Vis:  $V_{\text{max}}=4,7\pm0,4\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $K_m=0,43\pm0,09\text{mM}$ ). Assim, é possível concluir que o método electroquímico é o mais sensível para a quantificação da actividade de POase da hPON1.

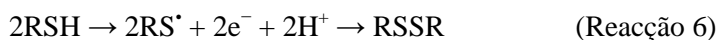
Segundo os estudos efectuados neste projecto, os parâmetros cinéticos obtidos pelos ensaios electroquímicos na formação de *p*-nitrofenol vão ao encontro com os valores obtidos na literatura para na monitorização da formação deste por espectroscopia Uv-Vis.

### 3.7-Estudo do sistema Homocisteína / Homocisteína-tiolactona

#### 3.7.1-Optimização de interface do eléctrodo de trabalho

Estudos efectuados à Hcy a pH fisiológicos demonstram a existência de um pico anódico a 600mV (para eléctrodos de pasta de carbono; 0,1M solução tampão fosfato pH 7) e a 640mV (para eléctrodos de pasta de nanotubos de carbono; 0,05M solução tampão fosfato pH 7,4) (Lawrence 2004, Aguí 2007). Até á data de escrita deste projecto, não se encontrou nenhum estudo electroquímico que infira sobre a Hcy-Tl em fluidos humanos.

O processo global da reacção de oxidação da Hcy (R-SH) é atribuído, inicialmente à oxidação de um protão da Hcy para gerar espécies radicais  $\text{R-S}^\bullet$ , que podem sofrer uma dimerização rápida e formar o dissulfureto (RSSR), de acordo com as seguintes reacções (Gong 2004, Aguí 2007):



Com o objectivo de otimizar a detecção electroquímica de Hcy e Hcy-Tl, fizeram-se estudos preliminares com diferentes tipo de interfaces. Todos os ensaios (na secção 3.7) foram realizados a valores de pH 7,6 e à temperatura ambiente. Concretamente, utilizaram-se eléctrodos de trabalho de CV e GP, modificados ou não com nanotubos de carbono de parede múltipla (previamente sujeitos a tratamentos térmicos e químicos:  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HNO}_3$  400,  $\text{O}_2$  500, Ureia a 1mg/ml a 0,5wt Nafion - Figura 3.12); nanopartículas  $\text{WO}_3$ , filme de páladio e platina (Figura 3.13).

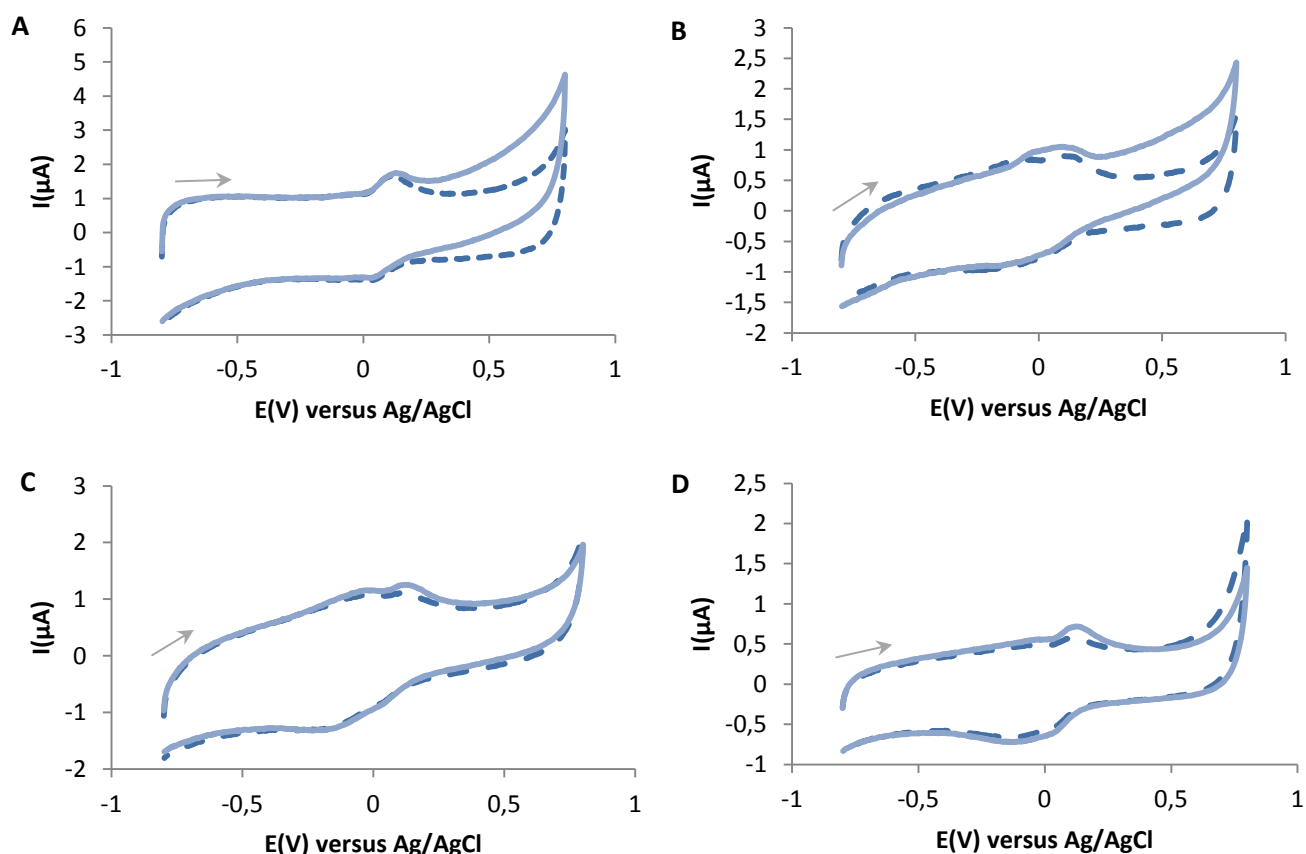


Figura 3.12: Detecção electroquímica da Hcy (200 $\mu$ M) a pH 7,6 à temperatura ambiente aplicando nanotubos de carbono de (A) O<sub>2</sub> 500, (B) de Ureia, (C) de HNO<sub>3</sub> e (D) de HNO<sub>3</sub> 400 ao eléctrodo de GP. A linha a tracejado corresponde ao branco e a linha contínua à reposta da Hcy.

Tal como se pode observar (Figura 3.12 e 3.13), não há uma grande alteração do voltamograma cíclico após a adição de Hcy. Apenas nos nanotubos de carbono O<sub>2</sub> 500 e Ureia (A e B da Figura 3.12) é que se verifica um aumento da corrente a um potencial de  $\approx 1$ V. É de salientar que, o sinal voltamétrico que se apresenta em todos os voltamogramas de nanotubos de carbono a um potencial de  $\approx 0$ V é atribuído ao comportamento redox de grupos funcionais contendo oxigénio que se encontram nas extremidades abertas dos nanotubos durante o seu pré-tratamento (Gong 2004). Nos ensaios com nanopartículas de WO<sub>3</sub>, paládio e platina, após a adição de Hcy verifica-se um aumento de corrente aquando o varrimento para potenciais de 1V. Contudo nenhum dos voltamogramas apresenta um pico mensurável de Hcy.

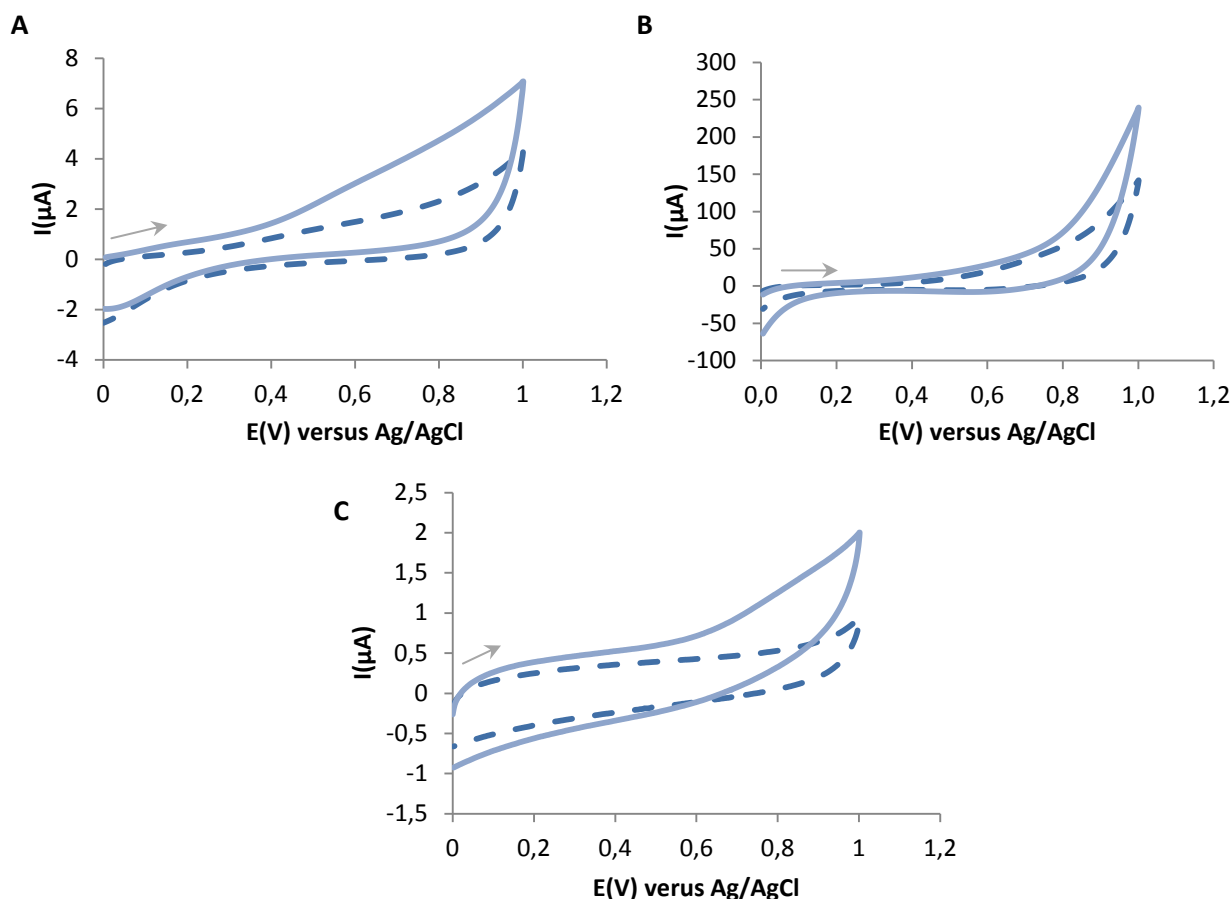


Figura 3.13: Resposta electroquímica da Hcy (200 $\mu$ M) a pH 7,6 à temperatura ambiente, utilizando (A) platina, (B) filme de paládio e (C) nanopartículas de WO<sub>3</sub> aplicadas ao eléctrodo de GP (1mg/ml em água), como interfaces de eléctrodo de trabalho. A linha a tracejado corresponde ao branco e a linha contínua à resposta da Hcy.

Os eléctrodos que apresentam os melhores resultados foram os eléctrodos de GP e de CV (posteriormente apresentados): as respostas electroquímicas obtidas com as restantes interfaces foram bastantes fracas/ inexistentes.

### 3.7.2-Quantificação de Hcy/Hcy-TI

#### 3.7.2.1-Eléctrodo de trabalho de grafite pirolítica

Na Figura 3.14 apresentam-se os VC obtidos com o eléctrodo de GP na presença de diferentes concentrações de Hcy. Como é possível observar, existe uma linearidade entre a intensidade de corrente observada e a concentração de Hcy no intervalo de 12,5-200 $\mu$ M.

É possível verificar na Figura 3.14 que, na janela de potencial usada, existe um pico anódico entre os potenciais de 700mV a 740mV versus Ag/AgCl, que corresponde à oxidação de Hcy.



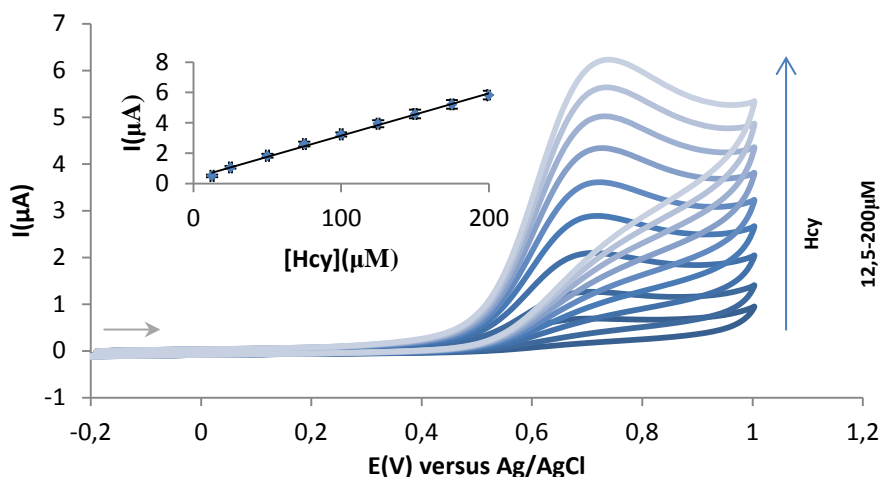


Figura 3.14: Detecção electroquímica de Hcy em eléctrodos de GP. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy (12,5-200  $\mu\text{M}$ ) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. *Incidência:* Variação da corrente do pico para várias concentrações de Hcy ( $y=0,028x+0,380$ ;  $R^2=0,996$ ). Os ensaios foram realizados em triplicados tendo-se representado o valor médio de corrente e respectivo desvio padrão.

Os ensaios efectuados a diferentes velocidades de varrimento resultam numa linearidade entre a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $v^{1/2}$ ) e a corrente do pico anódico ( $I_a$ ) da Hcy, sendo um processo controlado por difusão (Figura 3.15).

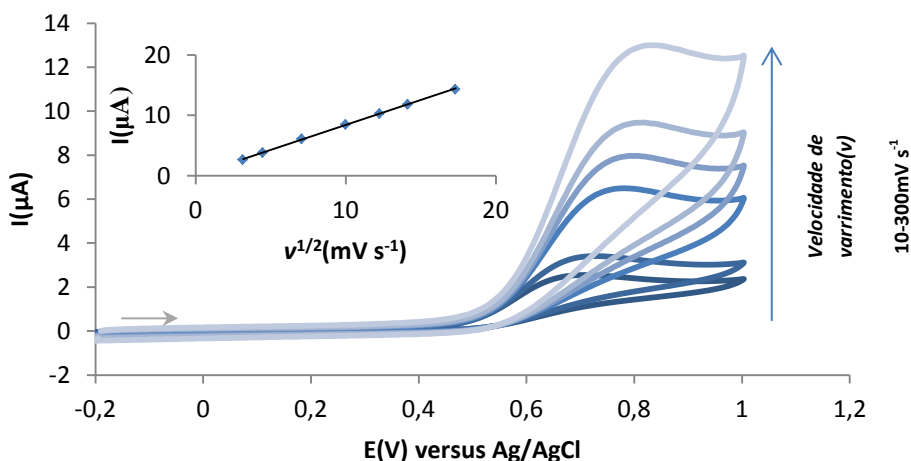


Figura 3.15: Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica de Hcy num eléctrodo de GP. VCs obtidos para uma concentração de Hcy de 200  $\mu\text{M}$  a pH 7,6 e à temperatura ambiente. *Incidência:* Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,823x+0,194$ ;  $R^2=0,9997$ ).

Na Figura 3.16 estão representados os VCs obtidos, para as mesmas condições experimentais, correspondentes à oxidação de Hcy-Tl. Observou-se um pico anódico entre os potenciais de 630 a 680 mV. O limite de detecção desta espécie foi bastante superior ao obtido com a Hcy, sendo que apenas se observou uma resposta electroquímica mensurável a concentrações de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 3.16). Tal como observado para a Hcy, o estudo da velocidade de varrimento demonstrou que a oxidação electroquímica de Hcy-Tl é controlada por difusão (Figura 3.17).

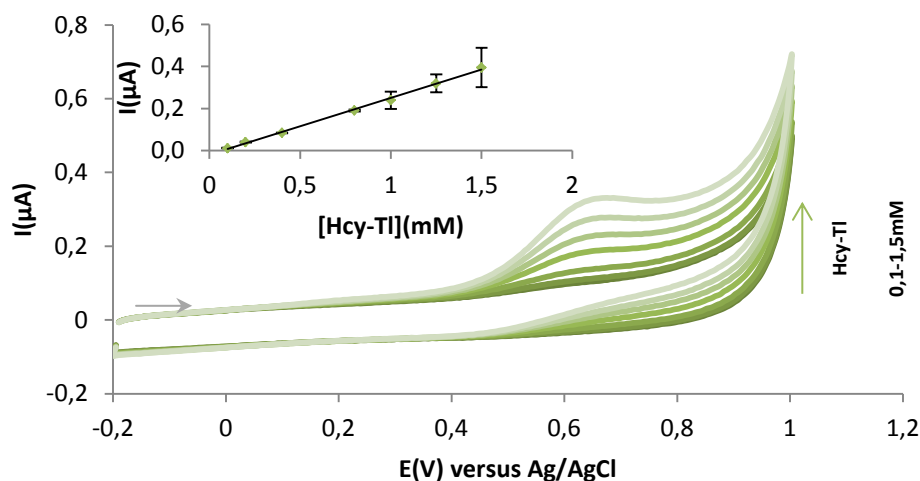


Figura 3.16: Detecção electroquímica de Hcy-Tl em eléctrodos de GP. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy-Tl (0,1-1,5mM) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. *Incidência:* Variação da corrente do pico anódico para várias concentrações de Hcy-Tl ( $y=0,270x-0,020$ ;  $R^2=0,997$ ). Os ensaios foram realizados em triplicados tendo-se representado o valor médio de corrente e respectivo desvio padrão.

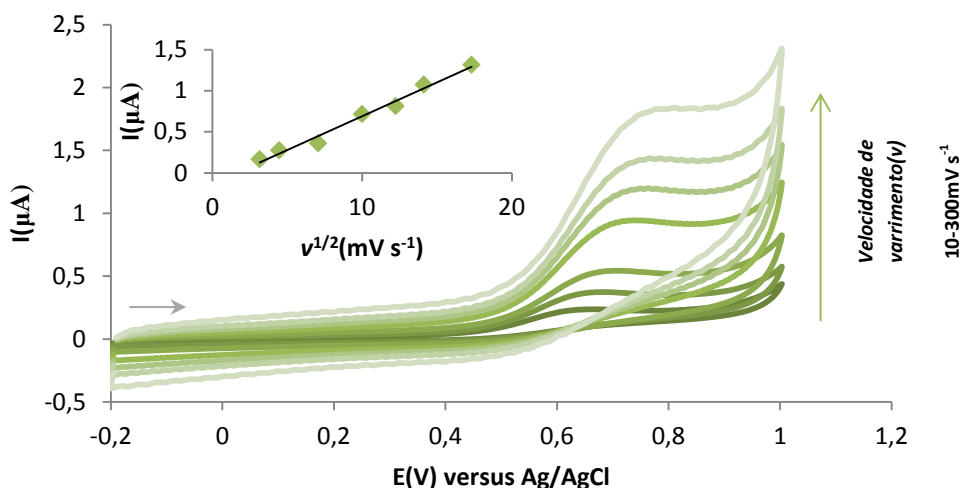


Figura 3.17: Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica de Hcy-Tl num eléctrodo de GP. VCs obtidos para uma concentração de Hcy-Tl de 1,5mM a pH 7,6 e à temperatura ambiente. *Incidência:* Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,082x+0,131$ ;  $R^2=0,985$ ).

### 3.7.2.2-Eléctrodo de trabalho de carbono vítreo

Utilizando o eléctrodo de carbono vítreo como eléctrodo de trabalho observou-se um pico anódico entre os potenciais de 650 a 770mV para a Hcy (Figura 3.18), sendo um processo também controlado por difusão (Figura 3.19). Quanto à Hcy-Tl verifica-se uma resposta electroquímica fraca entre os potenciais de 650 a 690mV (Figura 3.20) só sendo detectável a concentrações muito superiores à Hcy (concentrações superiores a 800μM). Assim como no

eléctrodo de trabalho de GP, a oxidação da Hcy-TI é um processo controlado por difusão (Figura 3.21).

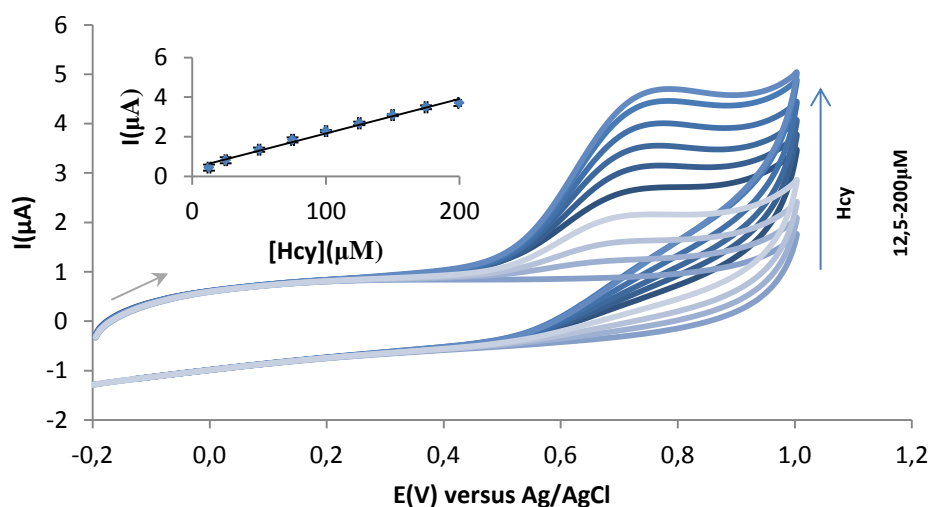


Figura 3.18: Detecção electroquímica de Hcy em eléctrodos de CV. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy (12,5-200 μM) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. *Incidência:* Variação da corrente do pico anódico para várias concentrações de Hcy ( $y=0,017x+0,419$ ;  $R^2=0,9889$ ). Os ensaios foram realizados em triplicados tendo-se representado o valor médio de corrente e respectivo desvio padrão.

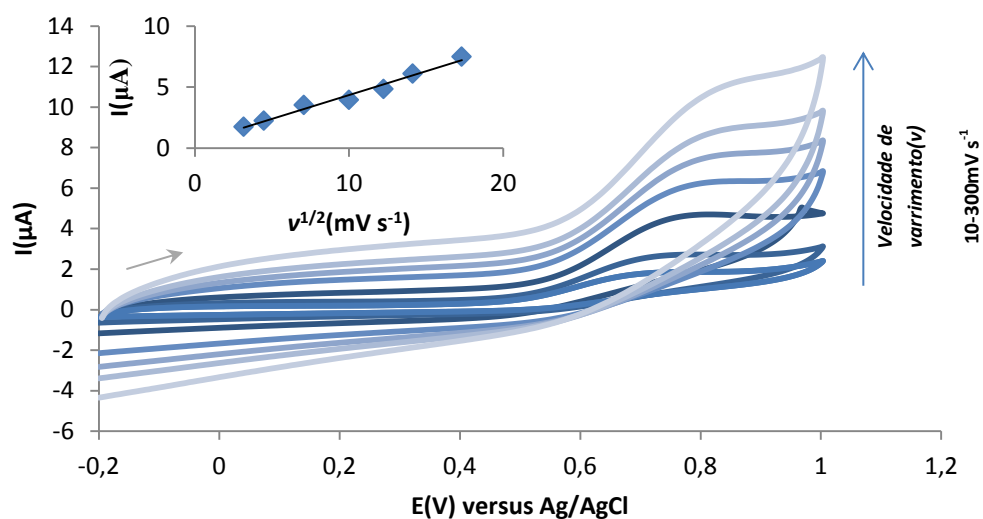


Figura 3.19: Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica da Hcy num eléctrodo de CV. VCs obtidos para uma concentração de Hcy de 200 μM a pH 7,6 e à temperatura ambiente. *Incidência:* Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,391x+0,455$ ;  $R^2=0,979$ ).

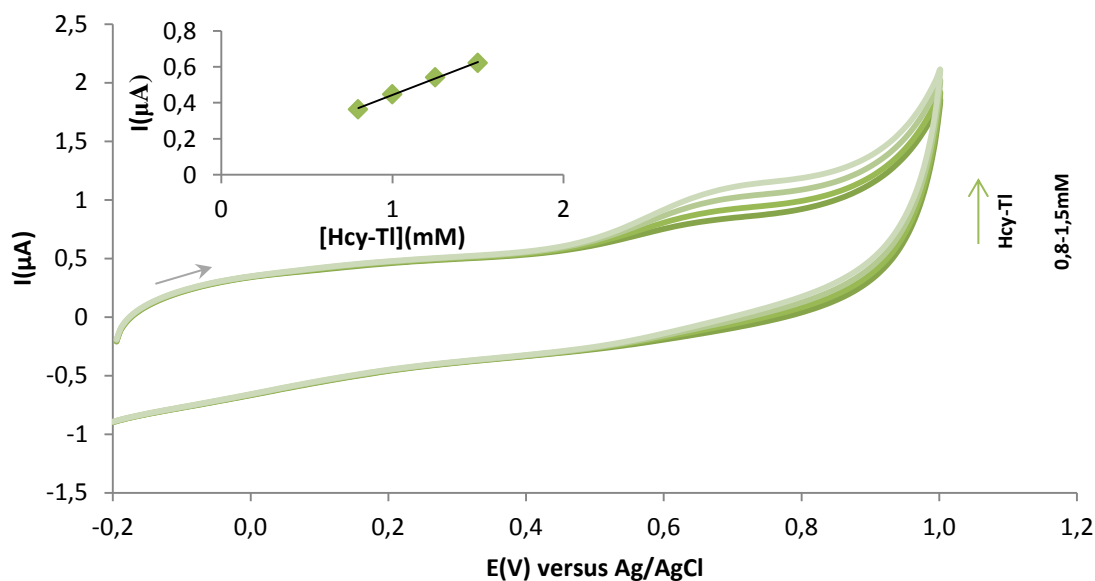


Figura 3.20: Detecção electroquímica de Hcy-TI em eléctrodos de CV. Os VCs foram obtidos a diferentes concentrações de Hcy-TI (0,8-1,5mM) a pH 7,6 e à temperatura ambiente. Incidência: Variação da corrente do pico anódico para várias concentrações de Hcy-TI ( $y=0,367x+0,077$ ;  $R^2=0,996$ ).

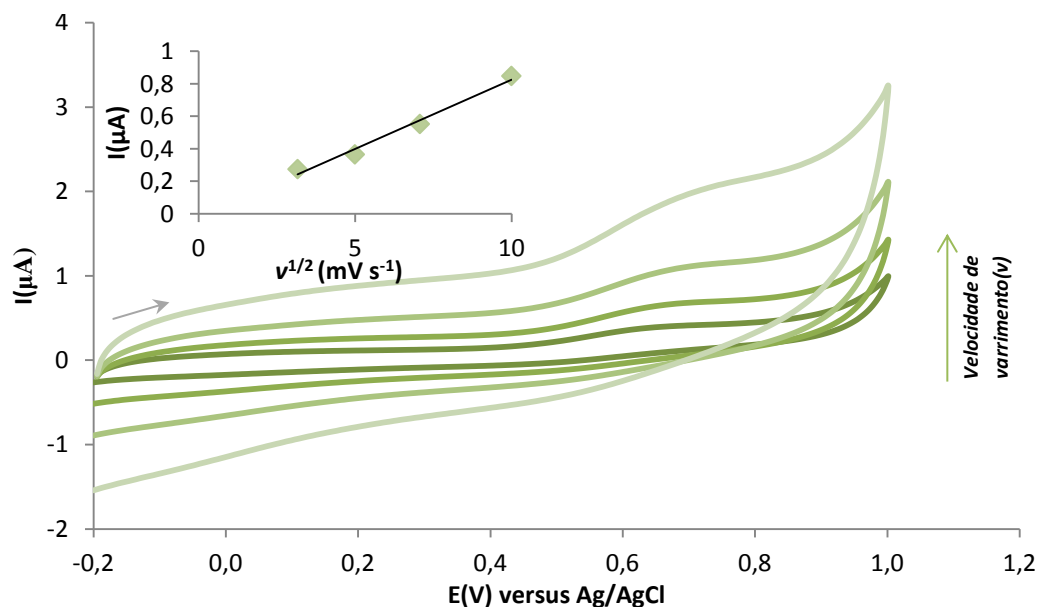


Figura 3.21: Efeito da velocidade de varrimento na resposta electroquímica de Hcy-TI num eléctrodo de GP.VCs obtidos para uma concentração de Hcy-TI de 1,5mM a pH 7,6 e à temperatura ambiente. Incidência: Variação de corrente do pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $y=0,086x-0,029$ ;  $R^2=0,983$ ).

Como foi discutido na secção 1.2, indivíduos com valores de Hcy superiores a  $5\mu\text{M}$  sofrem de hiper-homocisteinemia, pelo que é extremamente relevante a quantificação para valores inferiores a esta concentração.

Apesar do electrodo de trabalho de GP possuir uma melhor sensibilidade para a Hcy e Hcy-TI, ambas as espécies químicas têm um pico anódico para concentrações superiores a  $100\mu\text{M}$ . O facto de não ser possível observar qualquer resposta electroquímica da Hcy-TI a

concentrações inferiores a 800 $\mu$ M no electrodo de CV é vantajoso na posterior quantificação da actividade de lactonase da hPON1, uma vez que ambas as espécies químicas têm uma resposta numa janela de potenciais semelhante.

### 3.7.3-Pré-tratamentos

De modo a aumentar a sensibilidade do electrodo de CV, testou-se um pré-tratamento que consistia em efectuar 50 ciclos em VC numa janela de potenciais de 1,5 a 2V (para os mesmos parâmetros de amplitude e *step potential* descritos na secção 2.2) em duas soluções diferentes: (i) solução tampão 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 0,2M KCl e (ii) 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No pré-tratamento, todos os electrodos e a célula electroquímica foram sempre lavados abundantemente com água Millipore MilliQ e secados antes de prosseguir com o ensaio. Após a execução deste pré-tratamento prosseguiu-se à quantificação de Hcy/Hcy-TI.

Como é possível observar na Figura 3.23, a linearização obtida ao efectuar um pré-tratamento na solução eletrolítica é semelhante à linearização sem qualquer pré-tratamento pelo que não se ganha sensibilidade. No entanto, no pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é possível observar um claro aumento de sensibilidade face às restantes linearizações.

A quantificação de Hcy, sem qualquer tratamento efectuado ao electrodo de trabalho de CV, é mais sensível comparativamente aos restantes pré-tratamentos efectuados (Figura 3.25).

No entanto, se observarmos os potenciais a que ocorre a oxidação de Hcy/Hcy-TI rapidamente percebemos que ambos têm uma resposta electroquímica numa janela de potenciais semelhante (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5:** Valores de potenciais do pico anódico de Hcy e Hcy-TI nos ensaios de VC a pH 7,6 e à temperatura ambiente para os vários pré-tratamentos e a sensibilidade (do electrodo de trabalho de CV) para estes.

Espécie Química	Pré-tratamentos	Potenciais do pico anódico de Hcy/Hcy-TI (mV)	Sensibilidade (A.mM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )
Hcy	Sem pré-tratamento	650-770	2,23x10 <sup>2</sup>
	Pré-tratamento em solução	580-660	2,23x10 <sup>2</sup>
	Pré-tratamento em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	520-610	2,34x10 <sup>2</sup>
Hcy-TI	Sem pré-tratamento	650-690	4,71
	Pré-tratamento em solução	680-710	4,39
	Pré-tratamento em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	580-600	1,05x10 <sup>1</sup>

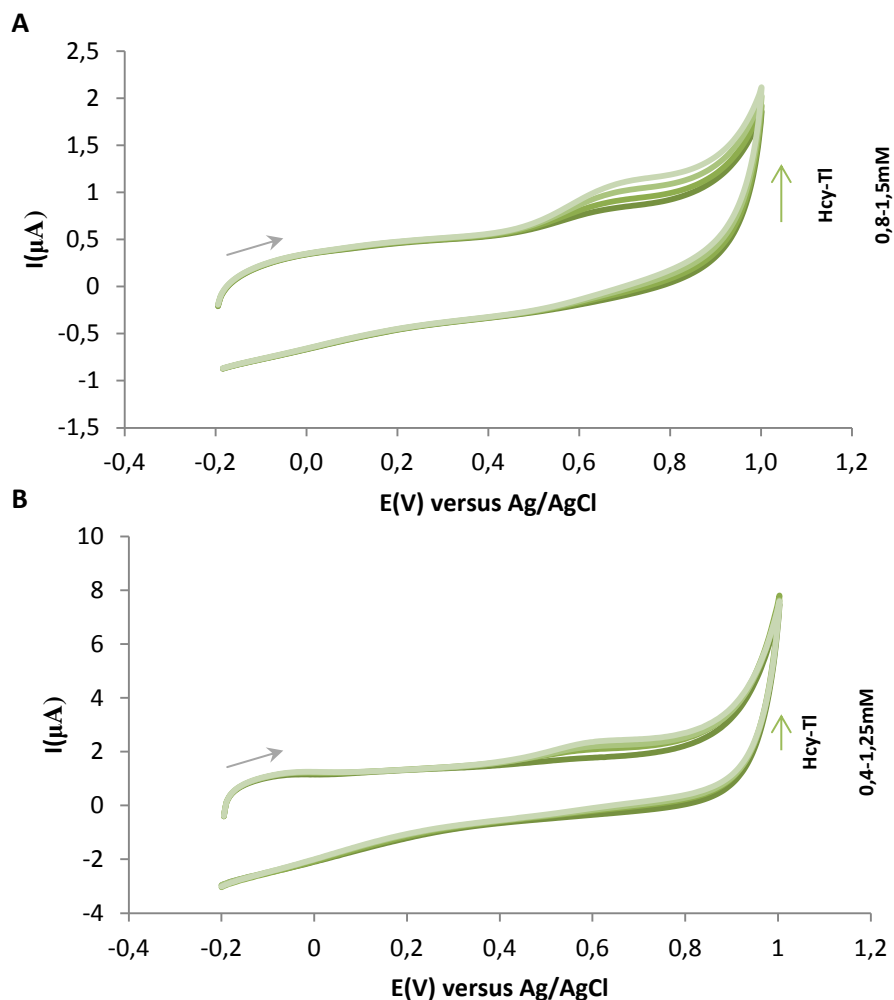


Figura 3.22: Ensaios de quantificação de Hcy-Tl a pH 7,6 à temperatura ambiente utilizando um (A) pré-tratamento na solução electrolítica e (B) um pré-tratamento em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , num eléctrodo de trabalho de CV.

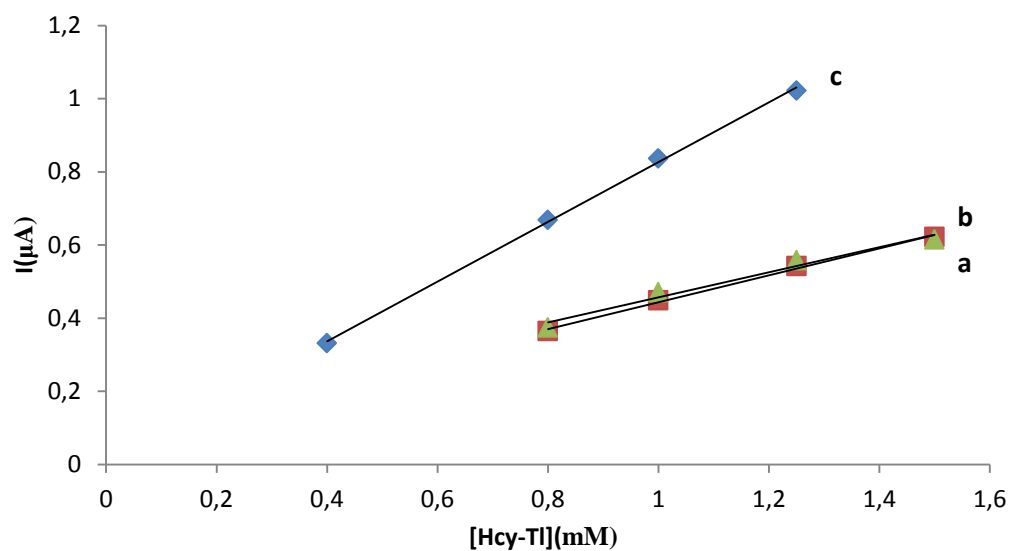


Figura 3.23: Linearizações obtidas para os pré-tratamento efectuados ao eléctrodo de trabalho de CV na quantificação de Hcy-Tl a pH 7,6 à temperatura ambiente: (a) sem pré-tratamento ( $y=0,367x+0,077$ ;  $R^2=0,9965$ ), (b) pré-tratamento efectuado na solução de electrolítica ( $y=0,342x+0,115$ ;  $R^2=0,976$ ) e (c) pré-tratamento em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $y=0,816x+0,0099$ ;  $R^2=0,9991$ ).

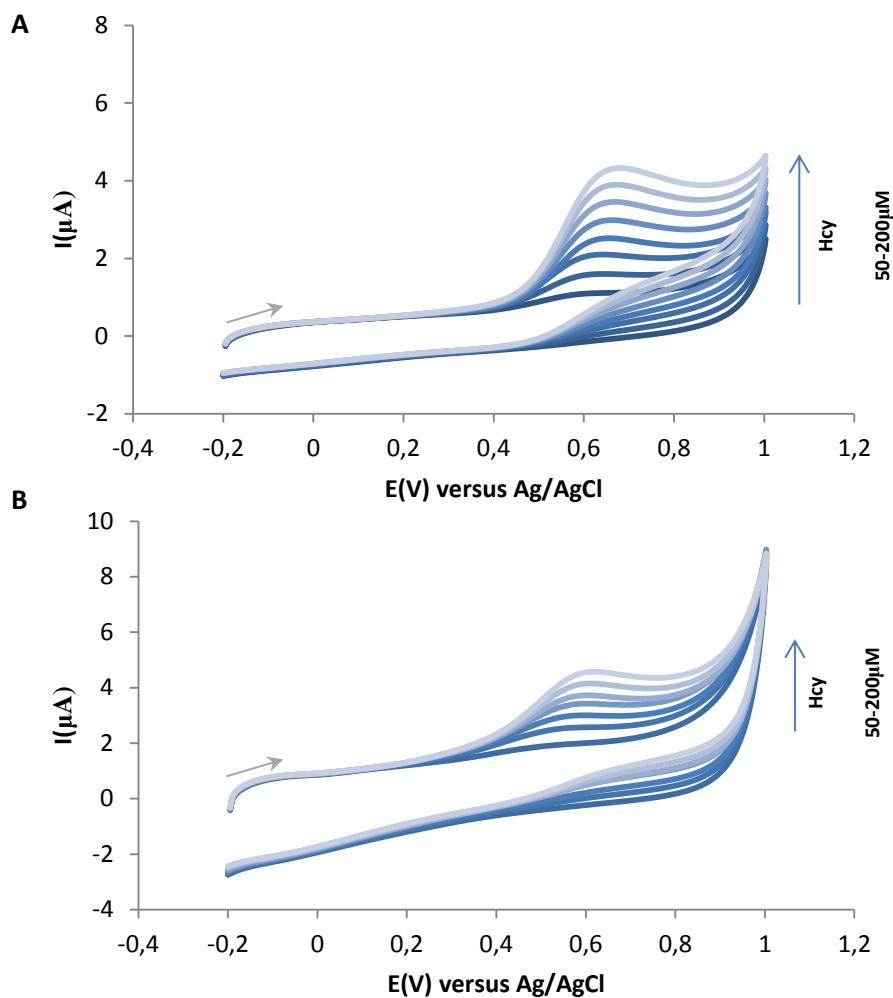


Figura 3.24: Ensaios de quantificação de Hcy a pH 7,6 à temperatura ambiente utilizando um (A) pré-tratamento na solução electrolítica e (B) um pré-tratamento em  $H_2SO_4$ , num eléctrodo de trabalho de CV.

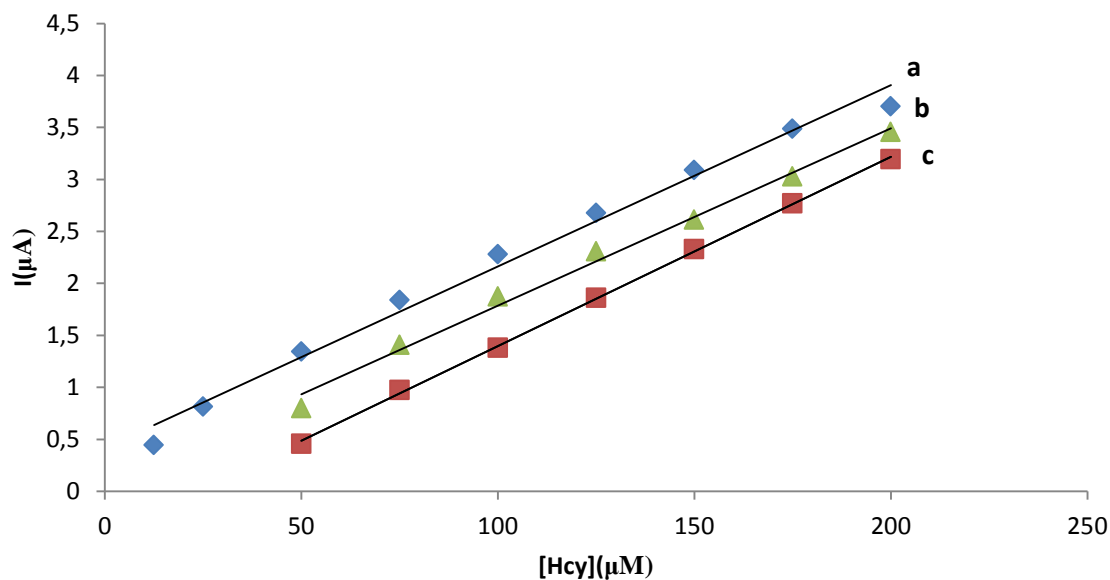


Figura 3.25: Linearizações obtidas para os pré-tratamento efectuados ao eléctrodo de trabalho de CV na quantificação de Hcy a pH 7,6 à temperatura ambiente: (a) sem pré-tratamento ( $y=0,017x+0,419$ ;  $R^2=0,989$ ), (b) pré-tratamento efectuado na solução de electrolítica ( $y=0,017x+0,078$ ;  $R^2=0,992$ ) e (c) pré-tratamento em  $H_2SO_4$  ( $y=0,018x-0,042$ ;  $R^2=0,9994$ ).

### 3.7.4.-Estudo preliminar da actividade de lactonase da hPON1

Na tentativa de estudar preliminarmente a actividade de lactonase da hPON1 efectuaram-se ensaios a pH 7,6 à temperatura ambiente, utilizando o eléctrodo de CV (ver secção 2.3.4). Para uma concentração inicial de 200 $\mu$ M de Hcy-TI e um volume de plasma de 200 $\mu$ l e de 400  $\mu$ l em 10ml de solução electrolítica total (Figura 3.26), observa-se um pico anódico na janela de potenciais de 328mV-355mV e um pico anódico a 708mV (aumentando ao longo do tempo de ensaio).

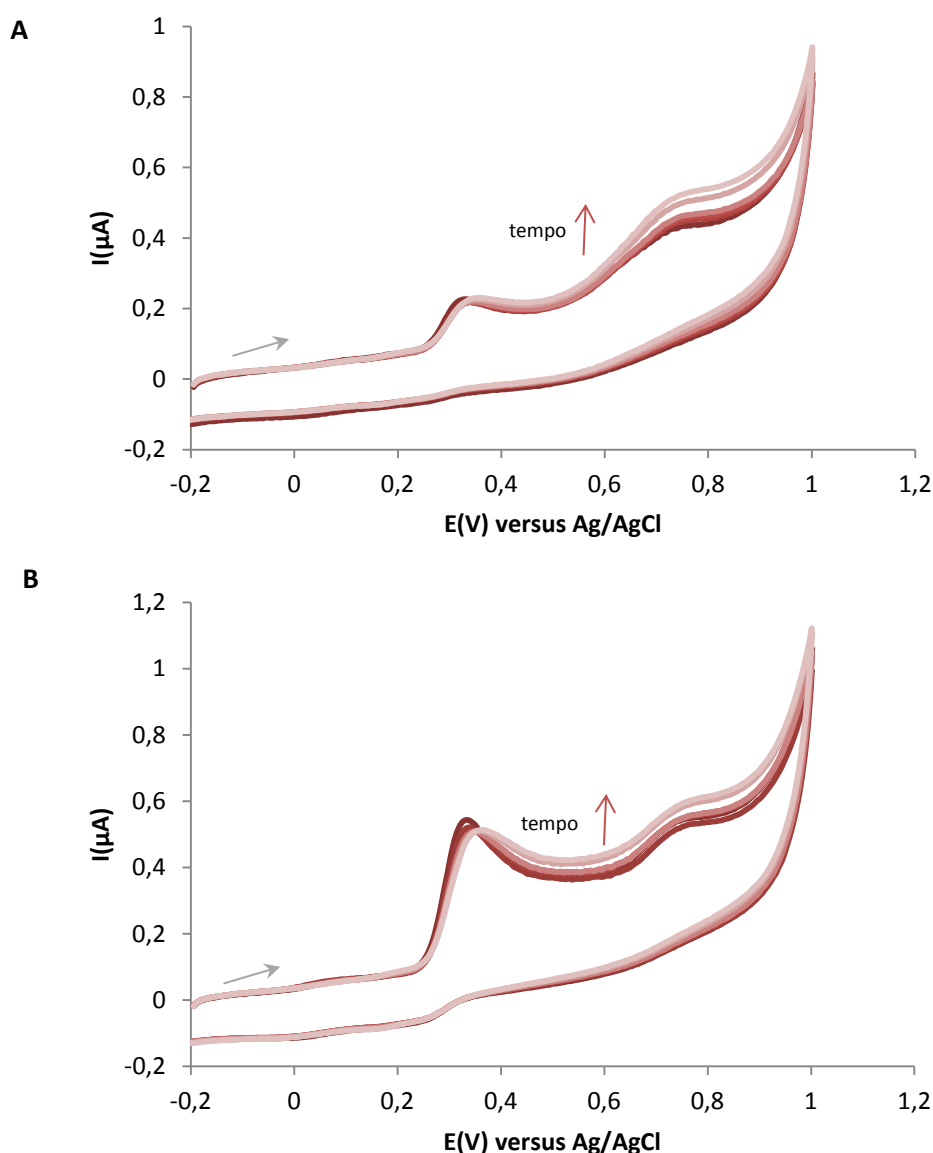


Figura3.26:Ensaio de actividade de lactonase da hPON1 a uma concentração fixa de Hcy-TI (200 $\mu$ M) ao longo do tempo (até 120 minutos).Ensaio efectuado a pH 7,6 à temperatura ambiente, para um volume de plasma de (A) 200 $\mu$ l e de (B) 400 $\mu$ l em 10 ml de solução electrolítica, num eléctrodo de trabalho de CV.



Na Figura 3.27, são comparados os ensaios efectuados com 200 $\mu$ l de plasma, na presença e ausência de 200 $\mu$ M Hcy-Tl. Como é perceptível, o pico anódico a 328mV não se altera significativamente entre estes dois ensaios, pelo que se pode concluir que este pico encontra-se relacionado com o plasma. O pico observado a potenciais mais elevados (708-710mV) pode corresponder de facto à conversão de Hcy-Tl a Hcy pela hPON1, resultado positivo para a caracterização da actividade de lactonase da hPON1.

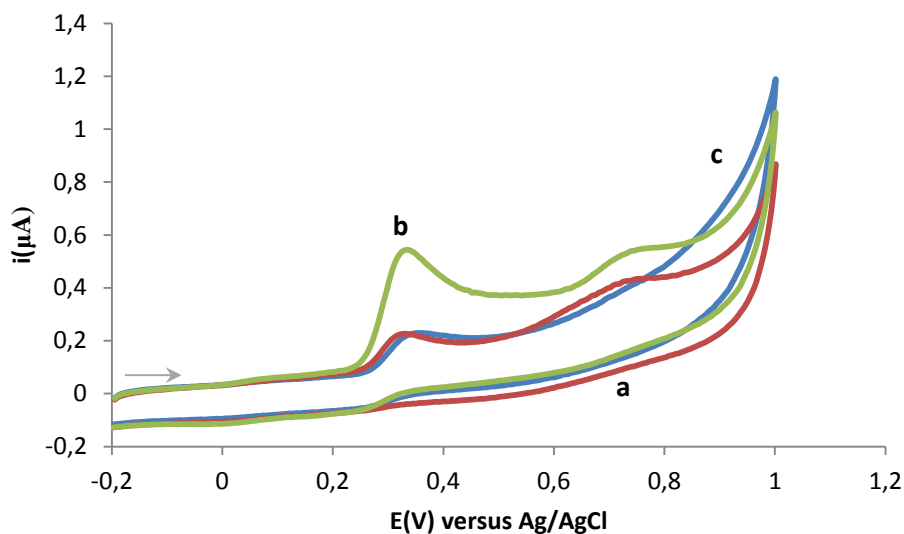


Figura 3.27: Resposta electroquímica (tempo inicial,  $t=0$ min) dos ensaios de actividade de lactonase da hPON1 a uma concentração fixa de Hcy-Tl (200 $\mu$ M), para um volume de plasma de (a) 200 $\mu$ l e de (b) 400 $\mu$ l, comparativamente a um ensaio controlo de (c) 200 $\mu$ l de plasma (sem Hcy-Tl) em 10 ml de solução electrolítica total. Ensaios efectuados a pH 7,6 à temperatura ambiente, num eléctrodo de trabalho de CV.



#### 4. Conclusão

Numa fase inicial procedeu-se ao estudo do sistema paraoxon/*p*-nitrofenol por voltametria de onda quadrada num eléctrodo de CV, onde se verificou que para os parâmetros reportados como óptimos para a actividade de POase da PON1 (pH 10,5 a 37°C) existia uma degradação química espontânea de paraoxon em *p*-nitrofenol, pelo que não seria viável a caracterização da actividade de POase nestas condições. De acordo com as combinações experimentais estudadas, observou-se que ao valor de pH 7,6 e à temperatura de 37°C, seria um bom compromisso entre os dois parâmetros.

Seguidamente, foram efectuados ensaios controlo por VOQ onde se observou uma variação da intensidade do sinal a 630mV referente à redução do paraoxon. Este dado é relevante uma vez que, sendo o pico de redução do paraoxon inconstante, não é possível seguir o consumo deste ao longo do tempo. Contudo, foi possível efectuar a monitorização do sinal relativo à formação de *p*-nitrofenol (758mV), ou seja, o produto da reacção enzimática da hidrólise de paraoxon.

Os parâmetros cinéticos da actividade de POase da hPON1 obtidos por ensaios electroquímicos foram comparados com os obtidos pelos ensaios espectrofotométricos. O ajuste dos dados segundo uma regressão não linear de acordo com a equação de Michaelis-Menten revelou valores de  $V_{\max}$  e  $K_m$  superiores nos ensaios electroquímicos (Eletroquímica:  $V_{\max}=31\pm3\mu\text{M min}^{-1}$ ,  $K_m=1,3\pm0,3\text{mM}$ ; Uv-Vis:  $V_{\max}=4,7\pm0,4\mu\text{M min}^{-1}$ ,  $K_m=0,43\pm0,09\text{mM}$ ) pelo que este métodos é mais sensível para a quantificação da actividade de POase da hPON1.

Na tentativa de optimização da detecção de Hcy para posterior caracterização da actividade de lactonase da hPON1, procedeu-se inicialmente ao estudo de diferentes interfaces do eléctrodo de trabalho. Os resultados obtidos mostraram que, os eléctrodos de GP e de CV são os mais sensíveis para a Hcy. Prosseguiu-se à quantificação de Hcy e de Hcy-TI em ambos os eléctrodos de trabalho a pH 7,6 e à temperatura ambiente. Verificou-se que os potenciais onde ocorre a oxidação de ambas as espécies químicas são muito semelhantes (electrodo de trabalho de CV; Hcy 650-770mV, Hcy-TI 650-690mV; electrodo de trabalho de GP; Hcy 700-740mV, Hcy-TI 630-680mV). Todavia, só é observada uma resposta electroquímica mensurável da Hcy-TI no eletrodo de trabalho de CV a concentrações superiores a 800 $\mu\text{M}$ , pelo que é um resultado favorável à quantificação da actividade de lactonase da hPON1 por eletroquímica, já que se pretende apenas monitorizar o produto de reacção enzimática, a Hcy ( $\text{Sensibilidade}_{\text{Hcy}}=2,23\times10^2 \text{ A.mM}^{-1} \text{ cm}^{-2} > \text{Sensibilidade}_{\text{Hcy-TI}}=4,71 \text{ A.mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ).

Os resultados obtidos neste projecto servirão de base no desenvolvimento de um bissosensor de Hcy-Tl para amostras reais.

## 5.Bibliografia

- Aguí, L., Pena-Farfal,C., Yáñez-Sedeno,P., Pingarrón,J.M. "Electrochemical determination of homocysteine at a gold nanoparticle-modified electrode." *Talanta*, 2007: 412–420.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahamood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M. "Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities." *Circulation*, 2000: 30;101(21):2510-7.
- Bald, E., Kaniowska,E., Chwatko,G., Glowacki,R. "Liquid chromatographic assessment of total and protein-bound homocysteine in human plasma." *Talanta*, 2000: 1233–1243.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R. "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications." *John Wiley and Sons, inc.*, 2001: 1-37.
- Benisty, J.I. "Cardiology Patient Page, Pulmonary Hypertension." *Circulation*, 2002: 106:192-194.
- Brushia, R.J., Forte,T.M., Oda,M.N., La Du,B.N., Bielicki,J.K. "Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1A." *Journal of Lipid Research*, 2001: 951-958.
- Ceron, J.J., Tecles,F., Tvarijonaviciute,A. "Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update." *Biomedical Veterinary Research*, 2014: 1-11.
- Chwatko, G., Jakubowski,H. "The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma." *Analytical Biochemistry*, 2005: 337:271–277.
- Costa, L.G., Vitaloneb, A., Colea, T.B., Furlong, C.E. "Modulation of paraoxonase (PON1) activity." *Biochemical Pharmacology*, 2005: 541–550.
- Daneshvar, P., Yazdanpanah, M., Cuthbert, C., Cole, D.E. "Quantitative assay of plasma homocysteine thiolactone by gas chromatography/mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003: 17:258–262.
- Dantoine, T.F., Drouet, M., Debord, J., Merle, L., Cogne, M., Charmes, J.P. "Paraoxonase 1 192/55 gene polymorphisms in Alzheimer's disease." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002: 239-244.
- Dias, C. G., Batuca, J.R., Marinho, A.T., Caixas, U., Monteiro, E.C., Antunes, A.M.M., Pereira, S.A. "Quantification of the arylesterase activity of paraoxonase-1 in human blood." *Analytical Methods*, 2014: 6,289–294.
- Draganov, D.I., La Du,B.N. "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review." *Naunyn Schmiedebergs. Archives of Pharmacology*, 2004: 369 : 78–88.
- Falk, E., Zhou, J., Møller, J. "Homocysteine and atherothrombosis." *Lipids*, 2001: 36(1):S3-S11.

- Fokine, A., Morales, R. Contreras-Martel, C., Carpentier, P., Renault, F., Rochu, D., Chabriere, E. "Direct phasing at low resolution of a protein copurified with human paraoxonase (PON1)." *Biological Crystallography*, 2003: D59,2083-2087.
- Garel, J., Tawfik, D.S. "mechanism of hydrolysis and Aminolysis of Homocysteine Thiolactone." *Chemistry European Journal*, 2006: 4144-4152.
- Golmanesh, L., Mehrani, H., Tabei, M. "Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2008: 70,1037–1042.
- Gong, K., Dong, Y., Xiong, S., Chen, Y., Mao, L. "Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes." *Biosensors and Bioelectronics*, 2004: 253–259.
- Gonzalvo, M.C., Gil, F., Hernández, A.F., Villanueva, E., Pla, A. "Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA ,metals and mercurials." *Chemico-Biological Interactions*, 1997: 169-179.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., Reimhult, E. "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures." *Sensors*, 2008: 8,1400-1458.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumstein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir.,H., Rabelli, R., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J., Tawfik, D. "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes." *Nature structural and molecular biology*, 2004: 11,412-419.
- Harvey, D. "Modern Analytical Chemistry , Eletrochemical Methods." 1999: 667-781.
- Hofera, S.E., Bennettsc,B., Chana,A.K., Hollowaya,B., Karschimbksd,C., Jenkinsd,A.J., Silinka,M., Donaghuea,K.C. "Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications." *Journal of Diabetes and its Complications*, 2006: 322–328.
- Hu, S., Xu, C., Wang, G., Cui, D. "Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a sodium montmorillonite-anthraquinone chemically modified glassy carbon electrode." *Talanta*, 2001: 54(1):115-123.
- Hussein, Y.M., Gharib, A.F., Etewa, R.L., ElSawy, W.H. "Association of L55M and Q192R polymorphisms in paraoxonase 1 (PON1) gene with breast cancer risk and their clinical significance." *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011: 351(1-2):117-123.
- Inoue, T., Kirchhoff, J.R. "Electrochemical detection of thiols with a coenzyme pyrroloquinoline quinine modified electrode." *Analytical Chemistry*, 2002: 1349–1354.
- Ito, T., Yasue,H., Yoshimura,M., Nakamura,S., Nakayama,M., Shimasaki,Y., Harada,E., Mizuno,Y., Kawano,H., Ogawa,H. "Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm." *Human Genetics*, 2002: 110(1):89-94.

- Jakubowski, H. "Calcium-dependent Human Serum Homocysteine Thiolactone Hydrolase." *The Journal of Biological Chemistry*, 2000: 275:3957-3962.
- Jakubowski, H. "Pathophysiological Consequences of Homocysteine Excess, 5th Amino Acid Assessment Workshop." *The Journal of Nutrition*, 2006: 1741-1749.
- Jakubowski, H. "The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples." *Analytical Biochemistry*, 2002: 308:112-119.
- Jakubowski, H. "The Role of Paraoxonase 1 in the Detoxification of Homocysteine Thiolactone." *Paraoxonases in Inflammation, Infection and Toxicology*, Humana Press, Springer Science, 2010: 660:113-127.
- Kaifer, A.E., Gómez-Kaifer, M. "Supramolecular Electrochemistry." *Wiley*, 1999: 1-36.
- Karban, A., Hartman, C., Eliakim, R., Waterman, M., Nesher, S., Barnett-Griness, O., Shamir, R. "Paraoxonase (PON)1 192R Allele Carriage is Associated with Reduced Risk of Inflammatory Bowel Disease." *Digestive Diseases and Sciences*, 2007: 52:2707-2715.
- Khersonsky, O., Tawfik, D.S. "Structure-Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest that Its Native Activity Is Lactonase." *Biochemistry*, 2005: 6371-6382.
- Kissinger, P.T. "Electrochemistry for the Non-Electrochemist." *Current Separation*, 2002: 20:2;51-53.
- Kitamura, Y., Umemura, T., Kanki, K., Kodama, Y., Kitamoto, S., Saito, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Masegi, T., Nishikawa, A., Hirose, M. "Increased susceptibility to hepatocarcinogenicity of Nrf2-deficient mice exposed to 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline." *Cancer Science*, 2007: 98(1):19-24.
- Kounaves, S.P. "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry." *Voltammetric Techniques*, 1997: 709-726.
- Kuo, C., La Du, B.N. "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases." *Structural Stability and Enzymatic Activity*, 1998: 26(7), 653-660.
- Lawrence, N.S., Deo, R.P., Wang, J. "Detection of homocysteine at carbon nanotube paste electrodes." *Talanta*, 2004: 443-449.
- Lusis, A.J. "Atherosclerosis." *Nature*, 2000: 407(6801):233-241.
- Luz, R.C.S., Damos, F.S., Oliveira, A.B., Beck, J., Kubota, L.T. "Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a lithium tetracyanoethylene (LiTCNE) modified glassy carbon electrode." *Talanta*, 2004: 935-942.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N. "Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein." *FEBS Letters*, 1991: 286:152-154.

- Madhu, R., Karuppiyah,C., Chen,S., Veerakumarb,P., Liu,S. "Electrochemical detection of 4-nitrophenol basedon biomass derived activated carbons." *Analytical Methods*, 2014: 5274–5280.
- Marchesani, M., Hakkarainen,A., Tuomainen,T.P., Kaikkonen,J., Pukkala,E., Uimari,P., Seppälä,E., Matikainen,M., Kallioniemi,O.P., Schleutker,J., Lehtimäki,T., Salonen,J.T. "New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men." *Journal of the National Cancer Institute*, 2003: 95(11):812-818.
- Martinelli, N., Girelli,D., Olivieri,O., Cavallari,U., Biscuola,M., Trabetti,E., Friso,S., Pizzolo,F., Tenuti,I., Bozzini,C., Villa,G., Ceradini,B., Sandri,M., Cheng,S., Grow,M.A., Pignatti,P.F., Corrocher,R. "Interaction between metabolic syndrome and PON1 polymorphisms as a determinant of the risk of coronary artery disease." *Clinical and Experimental Medicine*, 2005: 5(1):20-30.
- McGil Jr, H.C., McMahan,C.A., Gidding,S.S. "Preventing Heart Disease in the 21st Century: implications of the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study." *Circulation*, 2008: 117:1216-1227.
- Mendis, S., Puska,P., Norrving,B. "Global atlas on cardiovascular disease prevention and control." *Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization*, 2011: 3-54.
- Monk, P.M.S. "Fundamentals of Electro-Analytical Chemistry." *Wiley*, 2001.
- Nankai, H., Hashimoto,W., Murata,K. "Molecular Identification of Family 38  $\alpha$ -Mannosidase of *Bacillus* sp. Strain GL1, Responsible for Complete Depolymerization of Xanthan." *Applied and Environmental Microbiology*, 2002: 68(6): 2731–2736.
- Nekrassova, O., Lawrence,N.S., Compron,R.G. "Analytical determination of homocysteine: a review." *Talanta*, 2003: 1085-1095.
- Nelson, B.C., Pfeiffer,C.M., Sniegowski,L.T., Satterfield,M.B. "Development and evaluation of an isotope dilution LC/MS method for the determination of total homocysteine in human plasma." *Analytical Chemistry*, 2003: 775–784.
- Nexo, E., Engbaek, F., Ueland, P.M., Westby, C., O'Gorman, P., Johnston, C., Kase, B.F., Guttormsen, A.B., Alfheim, I., McPartlin, J., Smith, D., Møller, J., Rasmussen, K., Clarke, R., Scott, J.M., Refsum, H. "Evaluation of novel assays in clinical chemistry: quantification of plasma total homocysteine." *Clinical Chemistry*, 2000: 46(8):1150-1156.
- Nikolic-Hughes, I., Rees ,D.C., Herschlag,D. "Do Electrostatic Interactions with Positively Charged Active Site Groups Tighten the Transition State for Enzymatic Phosphoryl Transfer?" *Journal of the American Chemical Society*, 2004: 126(38):11814-11819.



- O'Dea, J.J., Ribes,A., Osteryoung,J.G. "Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1993: 287-301.
- Okabe, K., Wada,R., Uchiyama,K.S., Santa,T., Imai,K. "Development of hydrophilic fluorogenic derivatization reagents for thiols: 4-(N-acetylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole and 4-(N-trichloroacetylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole." *Journal of Chromatography A*, 2002: 111–118.
- Paşca, S.P., Dronca,E., Nemeş,B., Kaucsár,T., Endreffy,E., Iftene,F., Benga,I., Cornean,R., Dronca,M. "Paraoxonase 1 activities and polymorphisms in autism spectrum disorders." *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010: 14(3):600-607.
- Peacock, M. "Calcium Metabolism in Health and Disease." *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010: 523-530.
- Pedrosa, V.A., Codognoto,L., Avaca,L.A. "Electroanalytical determination of 4-nitrophenol by square wave voltammetry on diamond electrodes." *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003: 530-535.
- Pla, A., Rodrigo,L., Hernández,A.F., Gil,F., Lopez,O. "Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver." *Chemico-Biological Interactions*, 2007: 167(1):63-70.
- Précourt, L.P., Amre,D., Denis,M.C., Lavoie,J.C., Delvin,E., Seidman,E., Levy,E. "The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation." *Atherosclerosis*, 2011: 214(1):20-36.
- Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber,J., La Du,B.N. "The human serum paraoxonase/arylesterase gene(PON1) is one member of a multigene family." *Genomics (Genomics)*, 1996: 33:498-507.
- Reddy, S.T., Wadleigh,D.J., Grijalva,V., Ng,C., Hama,S., Gangopadhyay,A., Shih,D.M., Lusi,A.J., Navab,M., Fogelman,A.M. "Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids." *Arteriosclerosis,Thrombosis and Vascular Biology*, 2001: (4):542-547.
- Refsum, H., Ueland, P.M., Svardal, A.M. "Fully automated fluorescence assay for determining total homocysteine in plasma." *Clinical Chemistry*, 1989: 35(9):1921-1927.
- Richter, R. J., Jarvik, G. P. & Furlong, C. E. "Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009: 235,1-9.
- Ronkainen, N.J., Halsallband,H.B., Heineman,W.R. "Electrochemical biosensors." *The Royal Society of Chemistry*, 2010: 39:1747-1763.
- Scholz, F. "Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications." *Springer*, 2010: 121-135.

- Shih, D. M., L. Gu, Y-R. Xia, M. Navab, W-F. Li, S. Hama, L. W. Castellani, C. E. Furlong, L. G. Costa, A. M. Fogelman, and A. J. Lusis. "Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis." *Nature*, 1998: 394, 284–287.
- Souza, D.D., Mascaro, L.H., Filho, O.F. "A Comparative Electrochemical Behaviour Study and Analytical Detection of the *p*-Nitrophenol Using Silver Solid Amalgam, Mercury, and Silver Electrodes." *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011: 1-8.
- Ticianelli, E.A., Gonzalez, E.R. "Eletroquímica: Princípios e Aplicações." 1998: 17,11-23.
- Ueland, P.M., Refsum, H., Stabler, S.P., Malinow, M.R., Andersson, A., Allen, R.H. "Total Homocysteine in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications." *Clinical Chemistry*, 1993: 1764-1779.
- Ünsal, C., Albayrak, Y., Albayrak, N., Kuloğlu, M., Hashimoto, K. "Reduced serum paraoxonase 1 (PON1) activity in patients with schizophrenia treated with olanzapine but not quetiapine." *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2013: 1545—1552.
- Usuki, S. "Prospective Role of  $\beta$ -Cell-Specific IGF-1 for Oxidative Stress in the Pathogenesis." *Diabetes and Metabolism*, 2012: 1-6.
- Veerakumar, P., Madhu, R., Chen, S., Veeramani, V., Hung, C., Tang, P., Wang, C., Liu, S. "Highly stable and active palladium nanoparticles supported on porous carbon for practical catalytic applications." *Journal of Materials Chemistry A*, 2014: 16015-16022.
- Wang, J. "Analytical Electrochemistry, Second Edition." *Wiley-VCH*, 2000: 1-124.
- Wildgoose, G.G., Giovanelli, D., Lawrence, N.S., Compton, R.G. "High-Temperature Electrochemistry: A Review." *Electroanalysis*, 2004: 16(6): 421-433.
- Witte, I., Foerstermann, U., Devarajan, A., Reddy, S. T., Horke, S. "Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer." *Journal of Lipids*, 2012: 1-12.
- Yang, Y., Unnikrishnan, B., Chen, S. "Amperometric Determination of 4-Nitrophenol at MultiWalled Carbon Nanotube Poly(Diphenylamine) Composite Modified Glassy Carbon Electrode." *International Journal of Electrochemical Science*, 2011: 3902-3912.
- Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M. "Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds." *Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds, Ellis Horwood Ltd.*, 1989: 128-142.
- Zintzaras, E., Hadjigeorgiou, G.M. "Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis." *Journal of Human Genetics*, 2004: 474–481.
- Zoski, C. "Handbook of Electrochemistry." *Elsevier*, 2006: 1-50.

